

17 β -Estradiol: Phase II-Metabolismus und Genotoxizität oxidativer Metaboliten

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin

Silke Gerstner

aus Baden-Baden

Dekan:

Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent:

Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler

Korreferentin:

Prof. Dr. Doris Marko

Tag der mündlichen Prüfung:

20.10.2008

Für Oma Irma und meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Estrogene	1
1.1.1. Der Estrogenmetabolismus	3
1.1.1.1. Phase I-Metabolismus der Estrogene durch CYPs . . .	3
1.1.1.2. 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen	5
1.1.1.3. Phase II-Metabolismus der Estrogene	6
1.1.1.4. Kinetische Untersuchungen	13
1.1.2. Redoxcycling	15
1.1.3. Die Genotoxizität der CEs	17
1.1.4. Der Nachweis von DNA-Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden	19
1.1.5. Liposomen als Träger reaktiver Catechole	20
1.2. Die Isoflavone Daidzein und Genistein	22
2. Problemstellung	25
3. Ergebnisse	27
3.1. Die Glucuronidierung von E2 in verschiedenen biologischen Systemen .	27
3.1.1. Untersuchungen mit Humanlebermikrosomen	27
3.1.1.1. Einfluss der Isoflavone Daidzein und Genistein auf die Glucuronidierung von E2	28
3.1.1.2. Einfluss oxidativer E2-Metaboliten auf die Glucuronidierung von E2	29
3.1.2. Untersuchungen mit Rattenleber- und Rattennierenmikrosomen	32
3.1.2.1. Bestimmung der Kinetik der E2-3-Glucuronidierung mit RNM	33
3.1.2.2. Einfluss von Daidzein auf die E2-Glucuronidierung mit RNM	36

3.1.3.	Untersuchungen mit Zelllysate von kultivierten humanen Zelllinien	38
3.1.3.1.	Ergebnisse mit MCF-7-Zelllysate	39
3.1.3.2.	Ergebnisse mit HepG2-Zelllysate	40
3.2.	Phase II-Metabolismus von CEs in verschiedenen biologischen Systemen	42
3.2.1.	Die Methylierung der CEs	42
3.2.1.1.	Methylierung der CEs mit HLC	43
3.2.1.2.	Methylierung der CEs mit Zelllysate kultivierter Zellen	45
3.2.1.3.	Methylierung von CEs in kultivierten MCF-7- und HepG2-Zellen	53
3.2.2.	Die Glucuronidierung der CEs in verschiedenen biologischen Systemen	64
3.2.2.1.	Ergebnisse mit HLM	64
3.2.2.2.	Ergebnisse mit HepG2-Zelllysate	67
3.3.	Untersuchungen zur Genotoxizität der CEs	73
3.3.1.	Messung von DNA-Strangbrüchen in kultivierten Zelllinien . . .	73
3.3.2.	Messung von DNA-Strangbrüchen in Kalbsthymus-DNA	76
3.3.2.1.	Etablierung der AU von Kalbsthymus-DNA	77
3.3.2.2.	Messung der Induktion von DNA-Strangbrüchen durch CEs an Kalbsthymus-DNA	79
3.3.3.	Messung von DNA-Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden in kultivierten Zelllinien	80
3.3.4.	Untersuchungen mit Liposomen	83
3.3.4.1.	Herstellung der Liposomen	83
3.3.4.2.	Beeinflussung der Aufnahme von Quercetin in kulti- vierte V79-Zellen durch Liposomen	84
3.3.4.3.	Beeinflussung der Induktion von DNA-Strangbrüchen in kultivierten V79-Zellen durch Liposomen	88
4.	Diskussion	93
4.1.	Einfluss verschiedener Substanzen auf die E2-Glucuronidierung	93
4.2.	Phase II-Metabolismus der CEs und seine Bedeutung für ihre Toxizität	96
4.3.	Einfluss verschiedener Substanzen auf den Phase II-Metabolismus der CEs	103
5.	Zusammenfassung	107

6. Material und Methoden	111
6.1. Geräte, Chemikalien und Lösungen	111
6.1.1. Geräte und Hilfsmittel	111
6.1.2. Verbrauchsmaterialien	112
6.1.3. Chemikalien	113
6.1.4. Biologisches Material	114
6.1.5. Puffer und Lösungen	115
6.1.5.1. Puffer für die Präparation von Zellfraktionen	115
6.1.5.2. Farbreagenz für die Proteinbestimmung nach Bradford	115
6.1.5.3. Lösungen für die <i>In vitro</i> Assays	116
6.1.5.4. Lösungen für die Zellkultur	116
6.1.5.5. Lösungen für die AU	117
6.1.5.6. Lösungen für den MTT-Test	119
6.1.5.7. 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) mit Zusatz von 0,15 M NaCl für die Liposomenherstellung	120
6.2. Methoden	120
6.2.1. HPLC-Analytik	120
6.2.2. Präparation von Zellfraktionen	121
6.2.3. Proteinbestimmung der Zellfraktionen und der Zelllysate	121
6.2.4. <i>In vitro</i> Assays: Phase II-Reaktionen	122
6.2.4.1. Glucuronidierungsassay	122
6.2.4.2. COMT-Assay	123
6.2.4.3. Kombiniertes Glucuronidierungs- und COMT-Assay mit HepG2-Zelllysat	124
6.2.4.4. Extraktion mit Ethylacetat	124
6.2.4.5. Kinetische Untersuchungen	124
6.2.5. Identifizierung von Glucuroniden und Methylierungsprodukten .	126
6.2.6. Allgemeine Zellkulturarbeiten	127
6.2.6.1. Kultivieren und Passagieren der Zellen	127
6.2.6.2. Auftauen und Einfrieren der Zellen	127
6.2.6.3. Substanzinkubation von kultivierten Zellen	128
6.2.6.4. Herstellung von Zelllysat aus kultivierten Zellen	129
6.2.6.5. Extraktion von Zellkulturmedium mit Ethylacetat	129
6.2.7. Bestimmung der COMT-Aktivität nach Flavonoidinkubation . .	130

6.2.8. Nachweis von Glucuroniden im Medium von mit CEs inkubierten HepG2-Zellen	130
6.2.8.1. Saure Extraktion mit Ethylacetat sowie Spaltung der Glucuronide mit β -Glucuronidase Typ B-1 aus Rinderleber	130
6.2.8.2. Aussalzen der Glucuronide mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	131
6.2.9. Untersuchung der Stabilität von Catecholen in Zellkulturmedium bei Raumtemperatur	131
6.2.10. AU mit kultivierten Zellen	131
6.2.10.1. Methode A	131
6.2.10.2. Methode B	135
6.2.11. AU von Kalbsthymus-DNA	136
6.2.12. Untersuchungen mit Liposomen	137
6.2.12.1. Herstellung von Liposomen	137
6.2.12.2. Überprüfung der Aufnahme von L(Quercetin) in V79-Zellen	138
6.2.13. MTT-Test	139
6.2.13.1. Bestimmung der Cytotoxizität von Aroclor 1254	139
6.2.13.2. Bestimmung der Cytotoxizität des COMT-Inhibitors Ro 41-0960	140
6.2.14. Überprüfung der 2-HO-E2-Methylierung in MCF-7-Zellen beim Einsatz des COMT-Inhibitors Ro 41-0960	140
7. Literaturverzeichnis	143
A. Anhang	159
A.1. Externe Kalibrierungen	159
A.2. Methylierung der CEs mit V79-Zelllysate – Berücksichtigung der Umwandlung durch HSDs	160
A.3. Zusammensetzung der verwendeten DME-Medien	160
A.4. Einfluss der Isoflavone auf die COMT-Aktivität in humanen Zelllinien	161
B. Publikationen	163
C. Danksagung	167

Abkürzungsverzeichnis

A	Aktivierungskinetik (Hill-Kinetik)
AU	Alkaline Unwinding (Alkalische Entwindung)
CE(s)	Catecholestrogen(e)
Chinon	<i>ortho</i> -Chinon
CL _{int}	intrinsische Clearance (katalytische Effizienz)
COMT	Catechol- <i>O</i> -Methyltransferase
CYP(s)	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase(n)
DME(M)	Dulbecco's Modified Eagle's (Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E1	Estron
E2	17 β -Estradiol
E2-3-G/-17-G	17 β -Estradiol-3-Glucuronid/-17-Glucuronid
E3	Estriol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Estrogenrezeptor
F12	Ham's Nutrient Mixture F-12
FKS	Fetales Kälberserum
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion- <i>S</i> -Transferase
h	Stunde(n)

H	Hemmkinetik (Autoinhibition)
HA	Hydroxylapatit
HLC	Humanes Lebercytosol
HLM	Humane Lebermikrosomen
HO	Hydroxy
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HSD(s)	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase(n)
K _{0,5}	Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit (Hill-Kinetik)
K _m	Michaelis-Menten-Konstante (Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit)
K _s	Hemmkonstante
L(Quercetin)	Quercetin, das in Liposomen verpackt wurde
LUVs	large unilamellar vesicles (große unilamellare Vesikel)
Me	Methyl
MeO	Methoxy
Min	Minute(n)
MM	Michaelis-Menten-Kinetik
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MUVs	multilamellar vesicles (multilamellare Vesikel)
MW	Mittelwert
n	Hill-Koeffizient
NAD(P)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
NAD(P)H	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
NQO	NADPH-Chinon-Oxidoreduktase
P.	Protein

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RLM	Rattenlebermikrosomen
RNM	Rattennierenmikrosomen
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
S	Substratkonzentration
SA	Standardabweichung
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SD	Sprague-Dawley
sec	Sekunde(n)
SULTs	Sulfotransferasen
SUVs	small unilamellar vesicles (kleine unilamellare Vesikel)
SW	Spannweite
t-BuOOH	tertiär-Butylhydroperoxid
TFMU	4-Trifluormethylumbelliferon
TMBPA	3,5,3',5'-Tetramethylbisphenol A
U	Units (Enzymeinheiten)
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDPGA	Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure
UGT(s)	Uridin-5'-diphosphoglucuronyltransferase(n)
UV	Ultraviolett
v_{\max}	maximale Geschwindigkeit

1. Einleitung

1.1. Die Estrogene

Die Estrogene gehören, wie auch die Androgene und das Progesteron, zur Gruppe der Steroidhormone. Sie werden bei nicht schwangeren Frauen in der Prämenopause hauptsächlich in den Zellen des Ovars ausgehend von den Androgenen gebildet (s. Abbildung 1.1) [Bernstein und Ross (1993)]. Aber auch in der Plazenta, der Nebennierenrinde sowie in den Leydig-Zellen des Hodens können Estrogene produziert werden. Der entscheidende Schritt bei der Bildung der Estrogene stellt die Umwandlung von 4-Androsten-3, 17-dion (Androstendion) in Estron (E1) bzw. von Testosteron in 17 β -Estradiol (E2) durch den Aromatase-Komplex (Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase (CYP) 19) in den Granulosazellen des Ovars dar. Mit Hilfe von Carrierproteinen werden die Estrogene durch das Blut zu den Zielgeweben transportiert. Nach der Menopause produziert das Ovar kaum noch E2, so dass vor allem die Nebennierenrinde diese Aufgabe übernimmt. Die Nebennierenrinde bildet jedoch nur das Prohormon Androstendion, das in peripheren Geweben, die den Aromatase-Komplex besitzen (z.B. Fettgewebe, Muskel, Leber, Haarfollikel), in E1 überführt wird [Guillemette et al. (2004); Löffler und Petrides (1998); Silbernagl und Despopoulos (2001)]. Die Estrogene übernehmen vielfältige Aufgaben in der Entwicklung der weiblichen Geschlechtsmerkmale (z.B. Brustwachstum), aber auch während des Menstruationszyklus (z.B. Follikelreifung im Ovar, Proliferation der Uterusschleimhaut) und dem Befruchtungsvorgang (u.a. Vorbereitung der Spermien auf das Eindringen in die Eihülle) sind sie von großer Bedeutung. Unabhängig von diesen Effekten können sie auch in anderen Organen (wie Nieren-, Leber- oder Knochengewebe) Wirkungen entfalten [Roy und Liehr (1999)]. Mit den Estrogenen werden jedoch auch nachteilige Effekte in Verbindung gebracht. In Tierversuchen konnten durch hohe E2-Konzentrationen z.B. Nierentumoren im Hamster, Gebärmutterkrebs bzw. Leydig-Zelltumoren in Mäusen oder Hypophysentumoren in der Ratte erzeugt werden [Liehr (1990, 2000)].

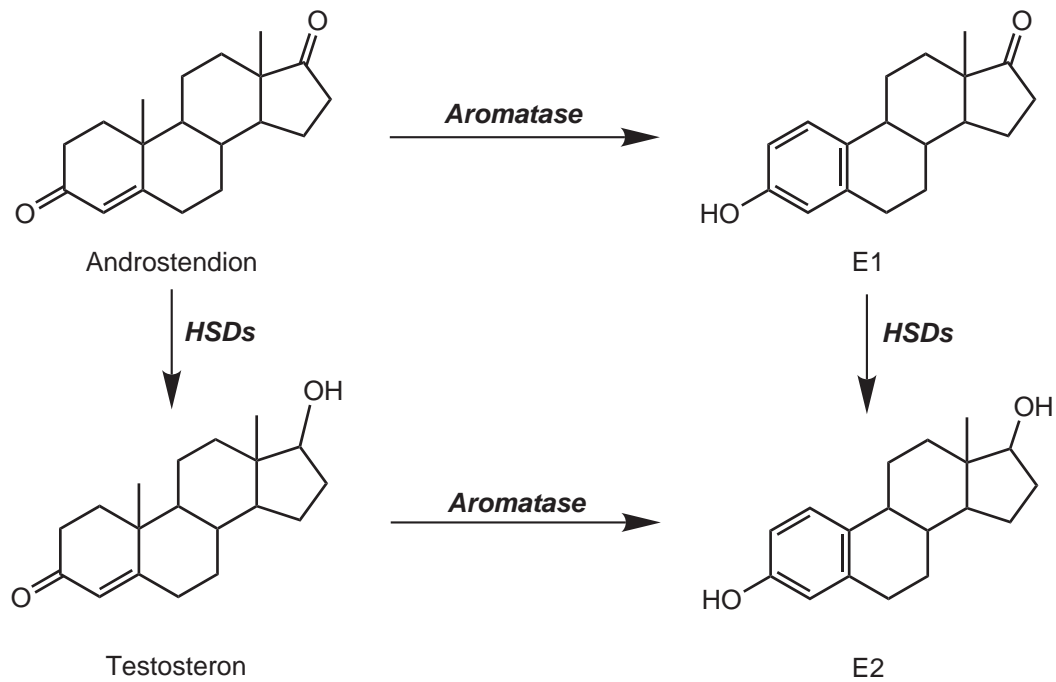


Abbildung 1.1.: Bildung von E2 und E1 aus Androstendion. HSDs, 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen.

Im Menschen stellen erhöhte E2-Plasmaspiegel über eine längere Zeitdauer einen Risikofaktor für die Entstehung von Tumoren in hormonabhängigen Geweben wie der Brust, der Prostata oder dem Endometrium dar. Deshalb werden u.a. einer späten Menarche sowie einer frühen Menopause protektive Effekte zugesprochen [Henderson et al. (1982); Roy und Liehr (1999); Thomas et al. (1997)]. Die zugrunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Eine Wirkungsweise des E2 ist die über seinen Rezeptor [Roy und Singh (2004)]. Die Bindung des E2 an den Estrogenrezeptor (ER), die anschließende Dimerisierung und Bindung des Dimers an eine spezifische, palindromische Sequenz innerhalb des Promotors der Zielgene (Estrogen-responsives Element) führt zur Beeinflussung der Expression verschiedener Gene (z.B. Wachstumsfaktoren), welche die Proliferation präneoplastischer, aber auch maligner Zellen unterstützen können [Ali und Coombes (2000); Roy und Singh (2004)]. Neben diesen epigenetischen Eigenschaften des E2 könnten zusätzlich ER-unabhängige Mechanismen, wie der Metabolismus des E2 zu reaktiven Metaboliten oder Redoxcycling-Prozesse, bei der Initiation von Tumoren beteiligt sein [Roy und Singh (2004); Yagi et al. (2001)]. Somit wird eine Kombination aus der Initiation von Tumoren durch reaktive E2-Metaboliten bzw. die Bildung

von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der proliferierenden Wirkung des E2 als Modell der E2-vermittelten Tumorentstehung diskutiert [Roy und Singh (2004)]. Auf den E2-Metabolismus und die Entstehung reaktiver Metaboliten wird im Folgenden näher eingegangen.

1.1.1. Der Estrogenmetabolismus

Die Estrogene werden im Körper sehr stark metabolisiert. Dabei spielen neben Oxidationsreaktionen sowohl Umwandlungen zwischen E2 und E1 als auch Konjugationsreaktionen wie die Methylierung, die Glucuronidierung oder die Sulfatierung eine große Rolle. Der Metabolismus der Estrogene findet nicht nur in der Leber, sondern auch in den Zielgeweben der Estrogenwirkung statt [Guillemette et al. (2004)].

1.1.1.1. Phase I-Metabolismus der Estrogene durch CYPs

E2 bzw. E1 können an verschiedenen Positionen oxidiert werden. Hauptsächlich finden dabei Hydroxylierungen und die Ausbildung von Ketogruppen statt [Lee et al. (2003); Martucci und Fishman (1993)]. Katalysiert werden diese Reaktionen in der Regel durch verschiedene CYP-Isoformen, die einer Enzymsuperfamilie angehören, oder durch Peroxidasen [Lekas et al. (2000); Roy et al. (2007)].

Durch CYPs wird ein Sauerstoffatom von molekularem Sauerstoff in das entsprechende Substrat eingebaut, das andere wird zu Wasser reduziert. Jedes CYP setzt sich aus den Komponenten Cytochrom P450 (Hämprotein) und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase zusammen, welche in die Membranen vor allem des endoplasmatischen Retikulums, des Zellkerns und der Mitochondrien eingebettet sind [Eisenbrand und Metzler (2002)]. Die CYPs benötigen für ihre Oxidationen die reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) als Cofaktor, die Peroxidasen dagegen H_2O_2 . Die höchste Konzentration der meisten CYPs liegt in der Leber vor (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C, CYP2E1 bzw. CYP3A), während niedrigere Konzentrationen im extrahepatischen Gewebe vorhanden sind. Eine Ausnahme stellt dabei z.B. CYP1B1 dar. Dieses Isoenzym kommt ausschließlich in extrahepatischem Gewebe vor [Wilkening und Bader (2003); Williams und Phillips (2000)]. Die CYPs können z.B. durch Barbiturate, 3-Methylcholanthren oder Aroclor 1254, eine Mischung verschiedener polychlorierter Biphenyle, induziert und dadurch ihre Aktivität gesteigert werden [Dubois et al. (1996); Eisenbrand und Metzler (2002)].

Beim Phase I-Metabolismus von E2 bzw. E1 werden vorrangig die Catecholestrogene

(CEs) 2-Hydroxy (HO)-E2, 2-HO-E1, 4-HO-E2 sowie 4-HO-E1 gebildet (s. Abbildung 1.2) [Cavalieri und Rogan (2006); Mueck und Seeger (2007)]. Während in der Leber hauptsächlich die 2-HO-CEs entstehen, stellen extrahepatisch die 4-HO-CEs den größeren Anteil dar [Ball und Knuppen (1990); Hiraku et al. (2001)]. Auch in der Niere des männlichen Syrischen Hamsters, der bei Zufuhr von Estrogenen Nierentumoren entwickelt und somit ein Modell für die Untersuchungen estrogenabhängiger Tumoren darstellt, konnte gezeigt werden, dass bei chronischer Estrogenbehandlung die Hydroxylierung an Position 4 vorherrscht [Liehr (1990); Weisz et al. (1992)]. Die Bildung der 2-HO-CEs wird in der humanen Leber durch CYP3A-Isoenzyme (vor allem CYP3A4) und CYP1A2 katalysiert, in extrahepatischen Geweben spielt bei der Oxidation dieser beiden CEs die CYP1A-Familie (vor allem CYP1A1, aber auch CYP1A2) die vorherrschende Rolle. Diese Isoenzyme konvertieren E2 zu ca. 80 - 85% zu 2-HO-E2 und, aufgrund mangelnder Substratspezifität, zu 15 - 20% zu 4-HO-E2. Die Metabolisierung zu den 4-HO-CEs findet in der Leber auch durch CYPs der 3A-Familie statt. In humanem extrahepatischem Gewebe katalysiert CYP1B1 die Bildung von 4-HO-E2 sowie 4-HO-E1 [Kerlan et al. (1992); Liehr (1997); Zhu und Conney (1998a)].

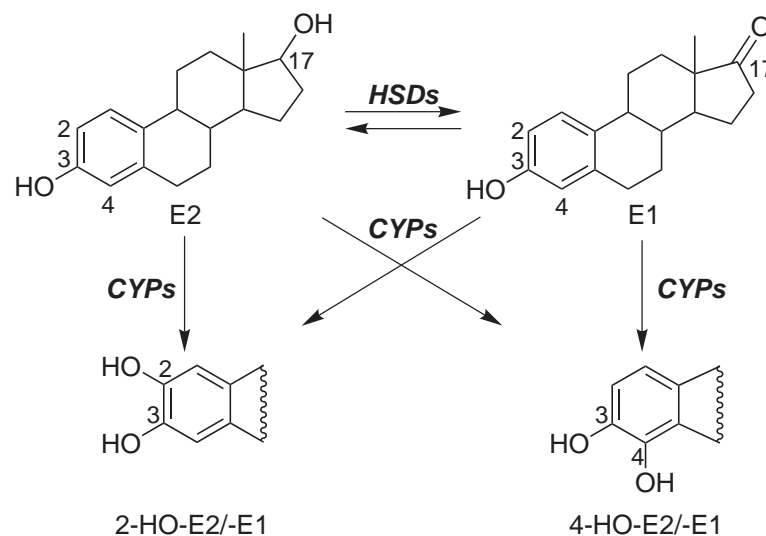


Abbildung 1.2.: Bildung von 2-HO-E2/-E1 bzw. 4-HO-E2/-E1 aus E2 bzw. E1. HSDs, 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen.

Werden die CEs weiter oxidiert, entstehen ihre entsprechenden Estrogen-2,3- bzw. Estrogen-3,4-Chinone, auf die in 1.1.2 noch einmal näher eingegangen wird. Diese *ortho*-Chinone (Chinone) können entweder enzymatisch (katalysiert durch die CYP-Isoenzyme, welche auch für die Bildung der CEs zuständig sind) oder nicht enzy-

matisch (in Anwesenheit von Übergangsmetallionen wie z.B. Cu^{2+}) gebildet werden [Khan et al. (2007); Zhang et al. (2007)].

Neben der Entstehung von 2-HO-CEs bzw. 4-HO-CEs gibt es noch einen zweiten Stoffwechselweg, der jedoch im Estrogenmetabolismus eine geringere Rolle spielt [Cavalieri et al. (2002)]. Durch die Oxidation von E1 zu 16α -HO-E1 (Abbildung 1.3, links), katalysiert durch CYP3A4, entsteht ein zusätzlicher Metabolit, der über die kovalente Modifikation des ER und die daraus resultierende Stimulierung der Zellproliferation mit der Entstehung hormonabhängiger Tumoren in Verbindung gebracht wird [Bolton et al. (1998); Rossi et al. (2007); Zhu und Conney (1998a)]. Wird 16α -HO-E1 an Position 17 reduziert bzw. E2 an Position 16 oxidiert, entsteht dabei Estriol (E3) (Abbildung 1.3, rechts). Während es früher ausschließlich als Antiestrogen angesehen wurde, da es u.a. im Urin von Schwangeren in sehr hohen Konzentrationen vorliegt, wird es heutzutage auch als Estrogen mit kurzer Wirkdauer beschrieben [Longcope (1984)]. Der Anteil von 16α -HO-E1 bzw. E3 an der Entstehung hormonabhängiger Tumoren ist jedoch noch unklar [Liehr (2000); Rogan et al. (2003); Zhu und Conney (1998a)].

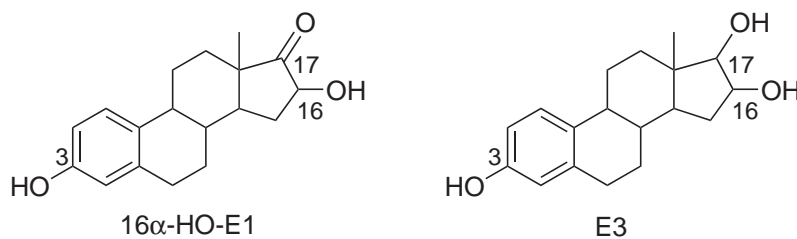


Abbildung 1.3.: Strukturformeln der Estrogenmetaboliten 16α -HO-E1 und E3.

1.1.1.2. 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen

Die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDs) stellen eine Gruppe von Isoenzymen dar, welche die gegenseitige Umwandlung zwischen 17β -Hydroxysteroiden und 17-Ketosteroiden katalysieren (s. auch Abbildung 1.1 bzw. 1.2), wobei die Oxidation von E2 zu E1 auch durch CYPs katalysiert werden kann [Zhu und Conney (1998a)]. Außerdem wird die Bildung von E3 aus 16α -HO-E1 durch HSDs ermöglicht [Tsu-tsui et al. (2000)]. Diese Enzyme werden in vielen verschiedenen humanen Geweben exprimiert (z.B. Leber, Plazenta, Ovar, Brust, Endometrium oder Fettgewebe), aber auch in kultivierten Zellen [Vihko et al. (2004); Zhu und Conney (1998a)]. Die HSDs haben verschiedene Substrat- und Cofaktorspezifitäten (vor allem Nicotinamid-

Adenin-Dinukleotid (NAD) bzw. seine reduzierte Form (NADH), weniger NADP(H)), Gewebeverteilung, subzelluläre Lokalisation und katalysieren verschiedene Reaktionen *in vivo*. So überwiegt beispielsweise im Uterus die Umwandlung von E2 zu E1 durch HSD Typ 2 (mit NAD als Cofaktor), im Brustgewebe dominiert jedoch die umgekehrte Richtung, katalysiert durch HSD Typ 1 (mit NADPH als Cofaktor). Die Umwandlung von E2 in das weniger aktive Hormon E1 im Zielgewebe wird als ein wichtiger Regulationsmechanismus der E2-Wirkung betrachtet [Labrie et al. (2000); Vihko et al. (2004); Zhu und Conney (1998a)].

1.1.1.3. Phase II-Metabolismus der Estrogene

Unter dem Phase II-Metabolismus werden verschiedene Konjugationsreaktionen zusammengefasst. Nachfolgend werden die Methylierung, Glucuronidierung und die Sulfatierung der Estrogene beschrieben.

Die Methylierung durch Catechol-O-Methyltransferasen

Die Methylierung durch Catechol-O-Methyltransferasen (COMT) stellt laut Literatur einer der wichtigsten Inaktivierungsmechanismen für die CEs dar. Sie führt jedoch zu lipophileren Produkten mit sehr langen Halbwertszeiten [Zhu und Conney (1998a)]. Die COMT katalysiert, in Anwesenheit von Magnesium (Mg^{2+}) als Cofaktor, die Übertragung einer Methylgruppe des Donors S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf eine der beiden Hydroxylgruppen eines Catechols (s. Abbildung 1.4). Das SAM wird dabei zu S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) umgewandelt.

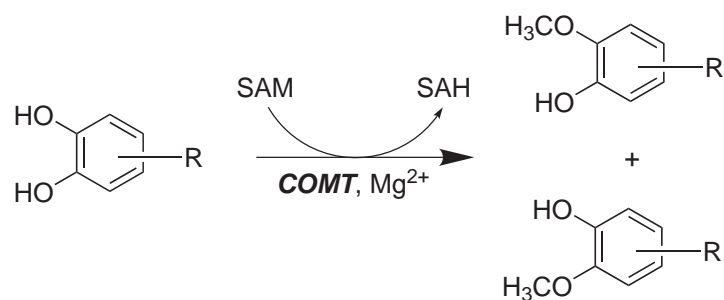


Abbildung 1.4.: Methylierung von Catecholen durch die COMT.

SAH stellt einen kompetitiven Inhibitor der COMT dar, welcher mit SAM um die gleiche Bindungstasche konkurriert. Hat SAH an das Enzym gebunden, kann keine Methylierung stattfinden, da SAH die dafür notwendige Methylgruppe nicht zur Verfügung

stellen kann, was einer nicht-kompetitiven Hemmung der COMT entspricht. Aufgrund dessen ist SAH der wichtigste endogene Inhibitor der COMT. Erhöhte intrazelluläre SAH-Konzentrationen können so zu einer verringerten Methylierung verschiedener Catechole führen. SAH wird enzymatisch, über Homocystein, wieder zu SAM umgewandelt [Zhu (2002)].

Zellfraktionierungen und immunologische Untersuchungen zeigten, dass die COMT in zwei verschiedenen Formen vorkommt [Dawling et al. (2001)]. Zum einen in der löslichen Form, die im Cytosol, aber auch im Nukleus lokalisiert ist, zum anderen wurde eine membrangebundene Isoform nachgewiesen, welche hauptsächlich in der Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums sitzt und der cytoplasmatischen Seite zugewandt ist [Zhu (2002)]. Die lösliche COMT wird nahezu in allen Geweben exprimiert, vor allem jedoch in der Leber und in der Niere [Dawling et al. (2001); Zhu und Conney (1998a)]. Dabei ist die Expression der löslichen Form in verschiedenen Geweben mindestens um den Faktor drei höher als die der membrangebundenen Form, weshalb die membrangebundene Form nur ca. 10% zur Gesamtaktivität beisteuert [Zhu und Conney (1998a); Zhu (2002)]. Eine Ausnahme stellt das menschliche Gehirn dar, in dem 70% des gesamten COMT-Proteins der membrangebundenen Form entsprechen.

Physiologische Substrate der COMT sind neben den CEs auch die Catecholamine. Außerdem stellen viele Arzneimittel aber auch Flavonoide (wie z.B. das Flavonol Quercetin) bzw. ihre Metaboliten Substrate der COMT dar, wobei exogene Substanzen deutlich bessere Substrate als die endogenen Catechole sind [Zhu (2002)]. Die Aktivität wird sowohl durch endogene (z.B. genetische Polymorphismen) oder exogene Faktoren (wie die Induktion oder Hemmung durch Stoffe aus der Umwelt) beeinflusst [Lu et al. (2007)]. Es wurde gezeigt, dass das Flavonol Quercetin, ein gutes Substrat der COMT, ein starker exogener Inhibitor der COMT ist und dadurch *in vivo* zu einer Hemmung der Methylierung von 2-HO-E2 bzw. 4-HO-E2 führte [Zhu et al. (1994); Zhu und Liehr (1996)]. Diese Hemmung wurde zum einen auf die direkte kompetitive Hemmung des Quercetins zurückgeführt, zum anderen auf die nicht-kompetitive Hemmung des gebildeten SAH und die verminderte Verfügbarkeit von SAM [Zhu und Liehr (1996)]. Einen anderen kompetitiven Inhibitor der COMT stellt das Nitrocatechol 2'-Fluoro-3, 4-Dihydroxy-5-Nitrobenzophenon (Ro 41-0960) dar, das selbst ein sehr schlechtes Substrat der COMT ist, aber sehr gut an das katalytische Zentrum des Enzyms bindet. Es hemmt dadurch die Methylierung anderer Substrate ohne den Verbrauch des Cofaktors. Die Bindung an das katalytische Zentrum ist reversibel [van

Duursen et al. (2004); Mannisto und Kaakkola (1999); Zahid et al. (2007)].

Vergleicht man die vier CEs miteinander, so werden die 2-HO-CEs besser methyliert als die 4-HO-CEs [Roy et al. (1990); Zhu und Liehr (1996)]. Die aus den CEs gebildeten Methoxyestrogene (s. Abbildung 1.5) haben keine oder nur eine geringe ER-Bindungsaffinität ($\leq 0,1\%$ verglichen mit E2) [Zhu (2002)].

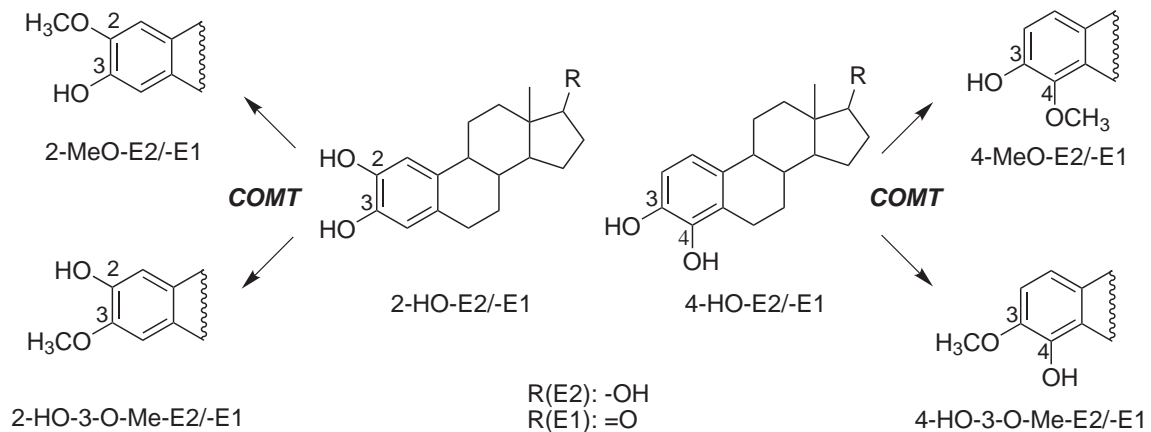


Abbildung 1.5.: Methylierung der CEs 2-HO-E2/-E1 bzw. 4-HO-E2/-E1 durch die COMT. Me, Methyl; MeO, Methoxy.

Neben der Detoxifizierung der CEs durch die Methylierung hat das dabei gebildete 2-Methoxy (MeO)-E2 zusätzlich biologische Effekte [Zhu und Conney (1998a)]. Es wurde gezeigt, dass 2-MeO-E2, in hohen, nicht-physiologischen Dosen (200 - 10000-fach höher), die Proliferation von Brustkrebszellen *in vitro* und *in vivo* hemmt. Als zugrunde liegende Mechanismen dafür werden eine Hemmung der Tubulin-Polymerisation [D'Amato et al. (1994)], Induktion der p53-vermittelten Apoptose oder Hemmung der Angiogenese diskutiert [Mueck und Seeger (2007); Zhu und Conney (1998a); Zhu (2002)]. Auch die Möglichkeit, dass es einen noch unidentifizierten intrazellulären Rezeptor spezifisch für 2-MeO-E2 bzw. einen anderen Effektor (einen Transkriptionsfaktor oder ein Enzym) gibt, wird diskutiert [Zhu und Conney (1998a)]. 2-MeO-E2 hemmte auch das Wachstum anderer humaner Krebszellen, jedoch scheinen humane Brustkrebszellen sensitiver dafür zu sein. Diese Effekte des 2-MeO-E2 wurden bei 2-MeO-E1 nicht nachgewiesen, obwohl es strukturell dem 2-MeO-E2 sehr ähnlich ist (s. Abbildung 1.5) [Zhu (2002)]. Aufgrund dieser Untersuchungen scheinen die beschriebenen Eigenschaften des 2-MeO-E2 sehr spezifisch zu sein, und es wird im Zusammenhang mit 2-MeO-E2 von einem protektiven endogenen Estrogenmetaboliten gesprochen [Dawling et al. (2001); Zhu und Conney (1998a)]. *In vitro* wurden in hohen

Konzentrationen jedoch auch nachteilige Effekte des 2-MeO-E2 nachgewiesen, wie z.B. morphologische Veränderungen von Embryo-Fibroblastenzellen des Syrischen Hamsters oder somatische Mutationen [Tsutsui et al. (2000)]. Außerdem hemmte 2-MeO-E2, aber auch 2-HO-E2, die Methylierung von 4-HO-E2 *in vitro*, so dass es dadurch zu einer Akkumulation von 4-HO-E2 kommen könnte. Umgekehrt war 4-HO-E2 nicht in der Lage die Methylierung von 2-HO-E2 zu vermindern [Roy et al. (1990); Zhu (2002)]. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Methoxyestrogene die CYP-vermittelte Oxidation von Estrogenen hemmten [Dawling et al. (2004)]. Die Methylierungsprodukte konnten durch CYPs demethyliert werden, was wiederum zu den CEs führen würde [Cavalieri et al. (2001)].

Die Glucuronidierung der Estrogene durch Uridin-5'-diphosphoglucuronyltransferasen

Die Glucuronidierung ist ein essentieller Mechanismus zur Inaktivierung und Eliminierung von endogenen Substanzen (z.B. Bilirubin, Gallensäuren, Retinoide oder Steroide), aber auch von vielen exogen zugeführten Stoffen wie Umweltschadstoffe, sekundäre Pflanzenstoffe (Flavonoide, Sapogenine) oder Arzneimittel (Opioide, Antihistaminika, Antidepressiva oder nichtsteroidale antiinflammatorische Arzneimittel) [King et al. (2000)]. Diese Konjugationsreaktion benötigt als Cosubstrat Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure (UDPGA) und wird durch Uridin-5'-diphosphoglucuronyltransferasen (UGTs) katalysiert. Dabei wird die Glucuronylgruppe des UDPGA im Rahmen einer nukleophilen Substitution (SN_2) auf nukleophile Gruppen wie Sauerstoff (Hydroxylgruppen, Carbonsäuren), Stickstoff (Amine), Schwefel (Thiole) oder Kohlenstoff übertragen. Die Reaktionsprodukte sind dabei das β -D-Glucuronid und Uridin-5'-diphosphat (UDP). Die Bildung eines β -D-Glucuronids zeigt Abbildung 1.6.



Abbildung 1.6.: Bildung eines β -D-Glucuronids.

Da die Glucuronsäure die Struktur der Substrate ändert, wird auch ihre biologische Aktivität beeinflusst, in dem z.B. das Binden an einen Rezeptor verhindert

wird [Guillemette et al. (2004)]. In der Regel resultiert die Glucuronidierung in einer Detoxifikation, es gibt aber auch Beispiele für biologisch aktive Glucuronide (z.B. das Morphin-6-Glucuronid oder das Codeinglucuronid) [King et al. (2000)]. Aufgrund der Bildung von polaren Metaboliten führt die Glucuronidierung zur Ausschleusung von Substanzen in Galle oder Urin [Uchaipichat et al. (2004)]. Glucuronide, die über die Galle ausgeschieden werden, können via β -Glucuronidase-katalysierte Hydrolyse durch Darmbakterien und nachfolgender intestinaler Resorption der gebildeten Ausgangssubstanzen einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen. Auch in der Leber oder direkt im Zielgewebe der Estrogenwirkung können durch β -Glucuronidasen die Ausgangssubstanzen wieder erhalten werden. So wurden z.B. in den Nieren des Syrischen Hamsters hohe β -Glucuronidase-Aktivitäten nachgewiesen. Dadurch wird der Verbleib von Substanzen im Körper verlängert, was einer Speicherung gleich kommt [Fisher et al. (2000); Zhu und Conney (1998a)].

Die UGTs stellen eine Superfamilie membrangebundener Enzyme dar, die nach Mackenzie et al. (1997, 2005a) benannt und in verschiedene Familien eingeteilt wurden [Guillemette et al. (2004)]. Die Isoenzymverteilung in den verschiedenen Geweben kann sehr unterschiedlich sein [Burchell und Coughtrie (1989)]. Die meisten humanen UGTs werden in der Leber exprimiert, sie kommen aber auch an allen Eintrittsstellen von Xenobiotika, wie z.B. im Darm, in der Haut, der Lunge oder im Epithel der Nasenmucosa vor. Darunter gibt es Isoformen, die ausschließlich in extrahepatischen Geweben exprimiert werden und nicht in der Leber, z.B. UGT2A1 im Nasenepithel oder UGT1A7, UGT1A8 bzw. UGT1A10 im Gastrointestinaltrakt [Tukey und Strassburg (2001); Uchaipichat et al. (2004)]. Aber auch in Zielgeweben der Estrogenwirkung, wie z.B. in der Brust oder im Uterus, wurden UGTs nachgewiesen [Lepine et al. (2004)]. Intrazellulär sind die UGTs auf der luminalen Seite der Membran des endoplasmatischen Retikulums und in der Kernhülle lokalisiert [King et al. (2000); Radomska-Pandya et al. (2001)].

Um die humane UGT-Aktivität *in vitro* abschätzen zu können, bedient man sich dem Einsatz von Modellsubstraten. Ein bekanntes Modellsubstrat, das von verschiedenen humanen UGT-Isoformen umgesetzt wird, ist das 4-Trifluormethylumbelliferon (TFMU) [Baranczewski et al. (2004)]. Die Expression der UGTs kann durch unterschiedliche Chemikalien, Arzneimittel oder Nahrungsmittelinhaltsstoffe induziert werden. So steigerte z.B. das Flavonoid Chrysin, das selbst ein gutes Substrat der UGTs darstellt, die Expression verschiedener Isoenzyme der UGT1A-Familie in humanen Darmkrebszellen (Caco-2) oder in humanen Leberkrebszellen (HepG2), wobei

am stärksten UGT1A1 induziert wurde [Galijatovic et al. (2001); Walle et al. (2000)]. Bezogen auf die Estrogene stellt die Glucuronidierung die einzige Konjugationsreaktion dar, die nicht nur zur Inaktivierung, sondern auch zur Ausschleusung der polaren Produkte aus den Zellen führt [Lepine et al. (2004)]. Für die Glucuronidierung der Estrogene spielen hauptsächlich Mitglieder der UGT1-Familie eine Rolle (UGT1A1, 1A3, 1A8, 1A9, 1A10), nur ein Isoenzym der UGT2-Familie, UGT2B7, ist auch an der Glucuronidierung der Estrogene beteiligt [Guillemette et al. (2004); Lepine et al. (2004)]. UGT2B7 katalysiert die Glucuronidierung des E2 an Position 17. Aber auch andere UGTs (z.B. UGT1A3) haben einen geringen Anteil an der E2-17-Glucuronidierung [Gall et al. (1999); Lepine et al. (2004)]. Für die Glucuronidierung von E2 an Position 3 ist in der humanen Leber UGT1A1 spezifisch, außerdem spielt extrahepatisch UGT1A8 eine Rolle [Guillemette et al. (2004); Senafi et al. (1994)]. Während das E2-3-Glucuronid (E2-3-G) biologisch inaktiv ist, kann das E2-17-Glucuronid (E2-17-G) zur Cholestase führen [Vore et al. (1997)]. E1 kann aufgrund seiner Struktur (s. Abbildung 1.1 bzw. 1.2) nur an Position 3 glucuronidiert werden und wird, im Vergleich zu E2, nicht so effizient umgesetzt. Vor allem UGT1A8, aber auch UGT1A1, glucuronidiert E1 [Lepine et al. (2004)]. Die CEs sind deutlich bessere Substrate als E2 bzw. E1 [Ball und Knuppen (1990)]. Die Glucuronidierung der CEs ist an den Positionen 3, 17 und 2 bzw. 4 möglich. In der Regel wird die Hydroxylgruppe an Position 3 der 2-HO-CEs glucuronidiert und die Hydroxylgruppe an Position 4 der 4-HO-CEs. Eine Glucuronidierung an Position 17 der CEs konnte nicht nachgewiesen werden [Lepine et al. (2004)]. Die 4-HO-CEs werden vorwiegend durch UGT2B7 umgesetzt (bei 4-HO-E2 spielt zusätzlich UGT1A8 eine Rolle), während die 2-HO-CEs vor allem durch UGT1A1 (2-HO-E2) und UGT1A8 (2-HO-E1) glucuronidiert werden [Cheng et al. (1998); Guillemette et al. (2004)]. Es wurde gezeigt, dass die Expression von UGT2B7 in Brusttumoren im Vergleich zu normalem Brustgewebe vermindert ist, was eine Erhöhung an 4-HO-CEs zur Folge haben kann [Guillemette et al. (2004)]. Zusätzlich sind die Methylierungsprodukte der CEs Substrate für die UGTs. Auch hier wurde die Position 17 im Molekül nicht glucuronidiert. Bei allen Methoxyderivaten wurde die höchste Aktivität für UGT1A8 nachgewiesen. Des Weiteren war UGT1A1 für die Glucuronidierung dieser Metaboliten zuständig [Lepine et al. (2004)].

Die Sulfatierung der Estrogene durch Sulfotransferasen

Neben den näher beschriebenen Methylierungs- und Glucuronidierungsreaktionen, stellt auch die Sulfatierung durch die Sulfotransferasen (SULTs) einen wichtigen Metabolisierungsweg der Estrogene dar. Die SULTs übertragen einen SO_3^- -Rest von dem Cofaktor 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) auf Hydroxyl-, Amino- oder Sulfhydrylgruppen von endogenen Substraten oder Xenobiotika [Glatt (1997)]. Sowohl die CEs und ihre Methylierungsprodukte als auch E2 bzw. E1 werden durch SULTs inaktiviert. E1-Sulfate stellen neben den Glucuroniden die wichtigsten zirkulierenden Konjugate der Estrogene dar. Sie haben eine niedrige metabolische Clearance bzw. eine lange Halbwertszeit (ca. 9 h) und werden deshalb als Estrogenspeicher bzw. E2-Vorstufen angesehen [Guillemette et al. (2004); Zhu und Conney (1998a)]. Wie bei der Glucuronidierung erhöht die Konjugation der Estrogene mit Sulfat ihre Wasserlöslichkeit und vermindert ihre Bindungsfähigkeit an den ER. Durch Sulfatasen können die gebildeten Sulfate in der Leber, aber auch in extrahepatischen Geweben wieder zu den entsprechenden Ausgangssubstanzen umgewandelt werden [Falany et al. (2002); Zhu und Conney (1998a)]. Die Sulfatierung stellt oft eine Detoxifikation dar, es gibt jedoch auch hier Beispiele für eine Aktivierung [Glatt et al. (2001)].

Ein Ungleichgewicht an aktivierenden bzw. inaktivierenden Enzymen ist ein kritischer Faktor in der Initiation estrogenabhängiger Tumoren [Cavalieri und Rogan (2006)]. Es konnten z.B. in Brusttumorgewebe höhere Konzentrationen an CYP1A1 bzw. CYP1B1, die für die Entstehung der CEs verantwortlich sind (s. 1.1.1.1), und niedrigere Gehalte an detoxifizierenden Enzymen, wie z.B. der COMT, im Vergleich zu Kontrollgewebe nachgewiesen werden [Singh et al. (2005); Wen et al. (2007)]. Bei allen am Estrogenmetabolismus beteiligten Enzymen gibt es interindividuelle Unterschiede in ihrer Expression, die durch genetische Faktoren, aber auch durch Umwelteinflüsse (Arzneimittel, Rauchen, Alkohol oder Nahrungskomponenten) verursacht werden [Zhu und Conney (1998a)]. So wurde z.B. in verschiedenen Untersuchungen eine Verbindung zwischen Polymorphismen in Genen metabolisch aktiver Enzyme und einem erhöhten Risiko für estrogenabhängige Tumoren diskutiert [Roy et al. (2007)]. Beispiele hierfür sind Polymorphismen im SULT1A1-, COMT- oder UGT2B7/-1A1-Gen [Guillemette et al. (2004); Mackenzie et al. (2005b); Thibaudeau et al. (2006); Zhu (2002)]. Es gibt jedoch auch einige Untersuchungen, bei denen kein Zusammenhang zwischen polymorphen Genen metabolisch aktiver Enzyme und einem erhöhten Risiko der Entwicklung estrogenabhängiger Tumoren bestand [Sellers et al. (2005); Suzuki et al. (2007)].

1.1.1.4. Kinetische Untersuchungen

Bei Untersuchungen des *in vitro* Metabolismus von Substanzen ist die Kenntnis der Kinetik von großer Bedeutung. Aus den kinetischen Parametern lässt sich die intrinsische Clearance (CL_{int}), d.h. die Effizienz mit der eine Substanz inaktiviert wird ohne dabei Enzymsättigung zu erreichen, berechnen. Nur diese erlaubt die Übertragung der *in vitro* Daten auf die *in vivo* Situation.

Bei vielen Reaktionen in unterschiedlichen biologischen Systemen kann die Beziehung zwischen der Metabolismusrate und der eingesetzten Substratkonzentration durch die klassische Michaelis-Menten-Kinetik, mit ihrem charakteristischen hyperbolen Kurvenverlauf, beschrieben werden (s. Abbildung 1.7).

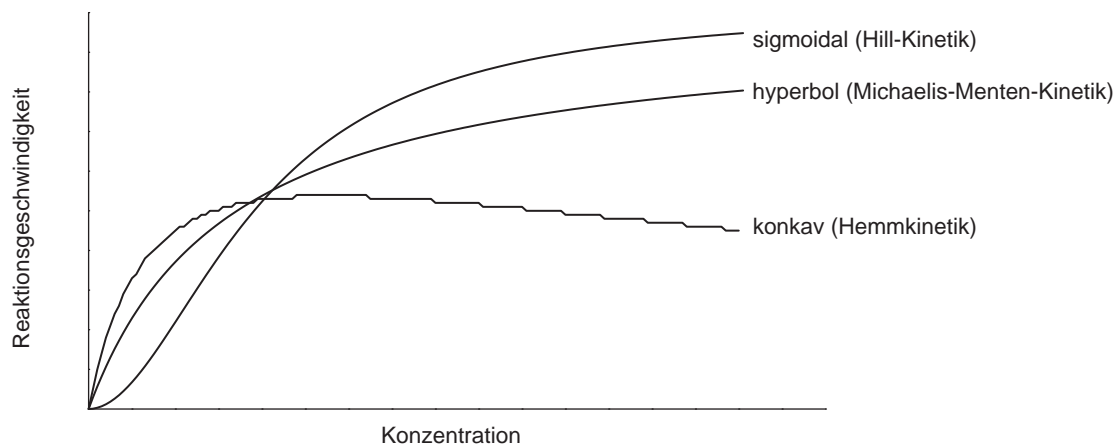


Abbildung 1.7.: Kurvenverläufe der Michaelis-Menten-, der Hill- (Aktivierungskinetik) sowie der Hemmkinetik (Autoinhibition).

Es gibt aber auch immer mehr Untersuchungen über enzymkatalysierte Metabolismuswege *in vitro*, die nicht dem Michaelis-Menten-Modell folgen. Ein Beispiel hierfür ist die Morphin-3- bzw. 6-Glucuronidierung katalysiert durch UGT2B7 [Stone et al. (2003)]. In dieser Arbeit spielen die Hill-Kinetik (Aktivierungskinetik) bzw. die Hemmkinetik (Autoinhibition) eine große Rolle. Die Hemmkinetik leitet sich von der Michaelis-Menten-Kinetik ab, da sie im niedrigen Konzentrationsbereich dem hyperbolen Kurvenverlauf folgt. Nachdem eine bestimmte Substratkonzentration überschritten wird, hemmt in der Regel das Substrat die Reaktion und die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt aufgrund der Hemmung. Dies führt schließlich zu einer konkaven Kurvenform (s. Abbildung 1.7). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) kann deshalb

bei hohen Substratkonzentrationen nicht erreicht werden. Die Hill-Kinetik resultiert in einer sigmoiden Kurvenform (s. Abbildung 1.7). Hierbei aktiviert eine Substanz A ihren eigenen Metabolismus (homotrope Aktivierung) oder eine andere, Substanz B, aktiviert den Metabolismus von Substanz A (heterotrope Aktivierung) [Houston und Kenworthy (2000); Hutzler und Tracy (2002)].

Für die Bestimmung des kinetischen Modells ist die Abbildung nach Eadie-Hofstee aussagekräftiger als die Auftragung der errechneten Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration. Während diese Darstellung bei einer Michaelis-Menten-Kinetik eine Gerade ergibt, zeigen die anderen beiden Kinetiken keine lineare Beziehung. Dies kann besonders bei der Bestimmung des sigmoiden Kurvenverlaufs der Hill-Kinetik hilfreich sein, da diese Kinetik sich vor allem bei geringen Konzentrationen von der hyperbolen Kurve der Michaelis-Menten-Kinetik unterscheidet [Houston und Kenworthy (2000)].

Die Voraussetzung für das Zugrundeliegen einer Michaelis-Menten-Kinetik ist, dass es pro Enzym nur eine Bindungsstelle für das Substrat gibt und, dass die Bindungsstelle eines jeden Enzyms unabhängig arbeitet. Es gibt bestimmte Eigenschaften verschiedener Substanzen, die deshalb nicht bzw. nur zum Teil mit dem Michaelis-Menten-Modell erklärt werden können. Sie benötigen ein Enzymmodell mit mehreren Bindungsstellen. Diese Annahme liegt oft den atypischen Enzymkinetiken zugrunde. Dabei ist darauf zu achten, dass diese Modelle nicht zwischen der gleichzeitigen Bindung mehrerer Moleküle innerhalb eines aktiven Zentrums und der Bindung von zwei Molekülen an zwei verschiedenen Bindungsstellen unterscheiden. Somit können die beiden Bindungsstellen auf verschiedenen Untereinheiten eines Dimers bzw. Oligomers lokalisiert sein, die miteinander kooperieren [Houston und Kenworthy (2000)]. Hinweise für diese Annahme stehen z.B. für CYP3A4 [Korzekwa et al. (1998)] bzw. UGT1A1 zur Verfügung. So soll UGT1A1 möglicherweise als Dimer oder sogar als Tetra- bzw. Hexamer vorliegen [Bruni und Chang (1999); Meech und Mackenzie (1997); Peters und Jansen (1986)].

Ob die beiden atypischen Kinetiken *in vivo* eine Rolle spielen, wird noch diskutiert. Man geht davon aus, dass zumindest die Hemmkinetik, aufgrund der hohen Konzentrationen, bei der die Hemmung erreicht wird, *in vivo* keine große Bedeutung hat. Aber auch wenn diese Modelle nicht *in vivo* nachgewiesen werden, hat ihre Präsenz *in vitro* Auswirkungen auf das Übertragen von *in vitro* Daten auf die *in vivo* Situation. Wird einer Reaktion die Michaelis-Menten-Kinetik zugrunde gelegt, obwohl eine atypische Kinetik das passendere Modell wäre, käme es im Falle der Hemmkinetik

zu einer Unterschätzung der kinetischen Parameter (z.B. v_{\max}). Bei der Hill-Kinetik ist sowohl eine Unterschätzung als auch eine Überbewertung der kinetischen Werte möglich. Diese Fehleinschätzungen führen dann zu einer falschen Interpretation der *in vivo* Situation [Houston und Kenworthy (2000)].

1.1.2. Redoxcycling

Die im Metabolismus der Estrogene gebildeten Chinone (s. 1.1.1.1) können enzymatisch, durch die NADPH-abhängige CYP-Reduktase bzw. NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (NQO) oder andere im Körper vorhandene Reduktasen, zu ihren entsprechenden Catecholen reduziert werden, wobei durch eine angeschlossene Autoxidation mit O_2 oder ebenfalls enzymatisch (CYPs, Peroxidasen) wiederum die Chinone entstehen (s. Abbildung 1.8) [Liehr (1990)]. Das Radikal des Semichinons stellt ein Intermediat bei den Ein-Elektron-Übergängen sowohl der Chinon-Reduktion als auch der CE-Oxidation dar. Wird die Reduktion der Chinone jedoch durch die NQO katalysiert, findet ein Zwei-Elektronen-Transfer statt, was die Bildung der Semichinonradikale umgeht [Liehr und Roy (1990)]. Sowohl bei der Oxidation der CEs zu den Semichinonradikalen als auch bei der Oxidation dieser Radikale zu den entsprechenden Chinonen können Superoxidradikale entstehen (s. Abbildung 1.8). Das Superoxidradikal kann, katalysiert durch das Enzym Superoxiddismutase oder auch spontan, dismutieren zu H_2O_2 , das in Anwesenheit von Metallionen (z.B. Fe^{2+} , Cu^{+}) zu den sehr reaktiven Hydroxylradikalen reagiert (Fenton-Reaktion) [Cavalieri und Rogan (2006); Liehr (1997)]. Das Redoxcycling ist deshalb ein Mechanismus der metabolischen Aktivierung, in dem fortlaufend neue ROS gebildet werden [Liehr (1997)].

Konsequenzen der Redoxcycling-Prozesse sind u.a. die Lipidperoxidation, Proteinoxidationen oder DNA-Schäden [Halliwell und Aruoma (1991); Liehr (1990, 1997)]. Die bei der Lipidperoxidation gebildeten Lipidhydroperoxide werden, im Gegensatz zu NADPH, als unregulierte Cofaktoren für die Oxidation der Estrogene zu den CEs und weiter zu den entsprechenden Chinonen diskutiert [Liehr (1994)], was zu einer abnormalen Steigerung der CE- bzw. Chinon-Bildung führen kann [Cavalieri und Rogan (2006)]. Auf die Entstehung von DNA-Schäden durch ROS wird in 1.1.3 noch näher eingegangen.

Es gibt enzymatische und nichtenzymatische Prozesse die Chinone bzw. die beim Redoxcycling entstandenen ROS zu inaktivieren. Z.B. können die Chinone durch Konjugation mit Glutathion (GSH), katalysiert durch die Glutathion-*S*-Transferasen (GSTs), inaktiviert werden [Dawling et al. (2004)]. Enzyme, die den Anteil an ROS

im Körper reduzieren, sind z.B. die Superoxiddismutase, Katalase oder Glutathionperoxidase. Daneben gibt es noch Substanzen mit antioxidativer Wirkung, z.B. Ascorbinsäure und α -Tocopherol oder Proteine, die Übergangsmetallionen (wie Fe^{2+} bzw. Cu^{+}) binden, damit diese die Bildung von ROS nicht beschleunigen können. Auch müssen DNA-Schäden in Folge von oxidativem Stress nicht unbedingt zur Tumorentstehung führen, da eine geringe Anzahl von Schäden sehr effizient repariert werden kann bzw. hohe ROS-Konzentrationen Apoptose induzieren können, damit die geschädigten Zellen nicht im Organismus verbleiben [Halliwell und Aruoma (1991)].

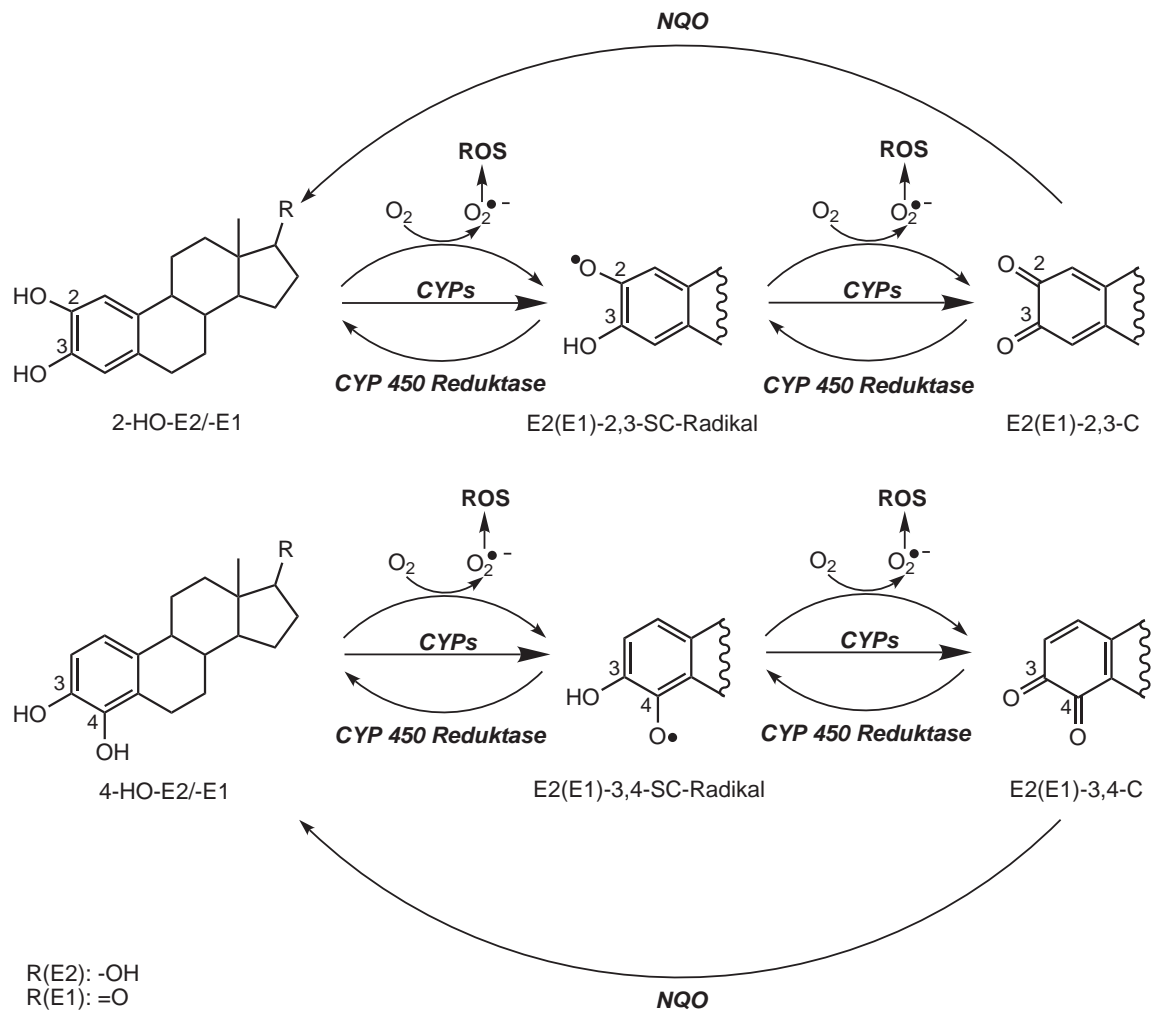


Abbildung 1.8.: Redoxcycling zwischen den CEs und ihren Chinonen. C, Chinon; NQO, NADPH-Chinon-Oxidoreduktase; SC, Semichinon.

1.1.3. Die Genotoxizität der CEs

Die CEs stellen potentere Kanzerogene dar als E2 selbst [Newbold und Liehr (2000)]. Sie können über die Bildung von Chinonen (s. 1.1.1.1 bzw. 1.1.2) kovalent an die DNA oder an nukleophile Stellen von Proteinen binden. Die Chinone sind elektrophil und als Michael-Akzeptoren in der Lage, Peptide, Proteine und/oder Nukleinsäuren zu alkylieren und dadurch kovalente Addukte mit Makromolekülen zu bilden [Liehr (1990); Rivera-Portalatin et al. (2007); Yagi et al. (2001)]. Dabei gelten besonders das E1- bzw. E2-3, 4-Chinon (s. Abbildung 1.8) als gefährlich, da sie mit Guanin (vor allem am N7) und zu einem geringeren Ausmaß auch mit Adenin (vor allem am N3) instabile depurinierende DNA-Addukte bilden [Cavalieri et al. (1997, 2000); Li et al. (2004)]. Die Instabilität ist in der Bindung des Chinons an das N7 des Guanins bzw. N3 des Adenins begründet, was die glycosidische Bindung destabilisiert und somit apurine Stellen erzeugt [Cavalieri et al. (1997); Lu et al. (2007); Stack et al. (1996)]. Diese apurinen Stellen können Mutationen verursachen, welche, wenn kritische Onkogene und/oder Tumorsuppressorgene betroffen sind, die Zelltransformation induzieren und somit zu Tumoren führen können [Cavalieri et al. (2006); Devanesan et al. (2001); Lu et al. (2007)]. Im Gegensatz dazu bilden die 2, 3-Chinone der Estrogene vorwiegend stabile DNA-Addukte, die bis zu ihrer Reparatur in der DNA bleiben. Depurinierende DNA-Addukte wurden bei diesen Chinonen nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen [Cavalieri et al. (1997); Stack et al. (1996); Zahid et al. (2006)].

Ebenfalls können aus den gebildeten Chinonen, infolge von Redoxcycling-Prozessen zwischen Chinonen und Catecholen (s. 1.1.2) ROS, wie z.B. reaktive Hydroxylradikale, entstehen. Diese Hydroxylradikale sind so reaktiv, dass sie mit allen Komponenten der DNA reagieren können. Sie entziehen z.B. H-Atome von der Desoxyribose, was zu Zuckerradikalen und letztendlich zum Verlust von Purin- oder Pyrimidinbasen und zu DNA-Strangbrüchen führt. Manche der veränderten Zucker bleiben in der DNA und werden bei Inkubationen mit alkalischer Lösung abgespalten, weshalb sie auch alkalilabile Stellen genannt werden [Halliwell und Aruoma (1991)]. DNA-Einzelstrangbrüche wurden z.B. in kultivierten MCF-7-Zellen durch das E1- bzw. E2-3, 4-Chinon induziert oder *in vivo* in den Nieren des Syrischen Hamsters nachgewiesen, der mit 4-HO-E2 behandelt wurde [Han und Liehr (1994); Nutter et al. (1994)].

Hydroxylradikale können auch an Guaninreste addieren und zwar an den Positionen C4, C5 und C8. Z.B. führt die Addition eines Hydroxylradikals an Position C8 zu einem Radikal, das zu 8-Hydroxy-2'-Desoxyguanosin (s. Abbildung 1.9) bzw. zu dem Mutagen 8-Oxo-2'-Desoxyguanosin oxidiert werden kann. 8-Hydroxyguanin wurde in

Urin von Säugern nachgewiesen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass solche oxidativen DNA-Schäden auch *in vivo* auftreten. Des Weiteren ist eine Ringöffnung möglich, bei der 2, 6-Diamino-4-Hydroxy-5-Formamidopyrimidin (Fapy) entsteht, dessen Strukturformel ebenfalls in Abbildung 1.9 zu sehen ist. Gleiches erfolgt, wenn eine Addition eines Hydroxylradikals an C4, C5 oder C8 des Adenins stattfindet. Die Produkte hierbei können u.a. 8-Hydroxyadenin oder 4, 6-Diamino-5-Formamidopyrimidine sein. Einzelstrangbrüche werden in der Regel schnell repariert, sie stellen auch Intermediate bei der Reparatur anderer Läsionen dar. 8-Hydroxyguanin wird dagegen langsam von der zellulären DNA entfernt, der Reparaturmechanismus ist unbekannt [Halliwell und Aruoma (1991)].

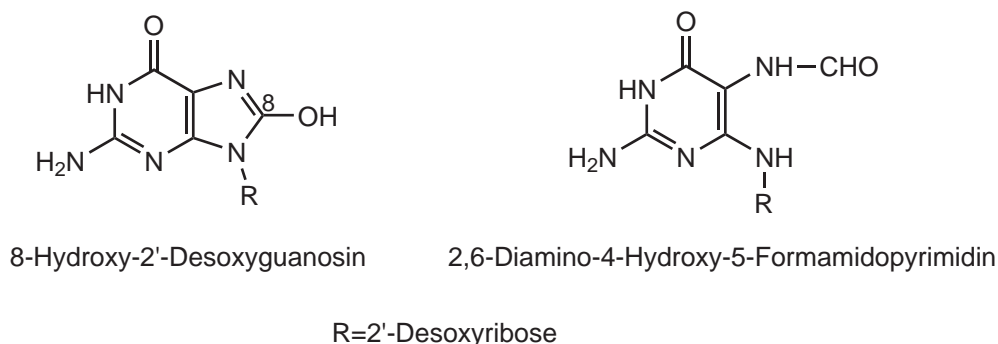


Abbildung 1.9.: Beispiele für durch ROS induzierte DNA-Schäden.

Neben Schäden an der DNA wurden sowohl *in vitro* als auch in Tierversuchen numerische sowie strukturelle Chromosomenaberrationen nachgewiesen [Roy und Liehr (1999); Roy und Singh (2004)]. Außerdem konnten für 4-HO-E2 und sein Chinon in Tierexperimenten Genmutationen gezeigt werden [Cavalieri und Rogan (2006)]. Zusätzlich stellen die CEs Liganden des ER dar und können so die Zellproliferation beeinflussen. Dabei entspricht die Bindungsfähigkeit von 2-HO-E2 und 4-HO-E2 ca. 25% bzw. 50% derer von E2. Etwas geringere Werte wurden mit den E1-CEs ermittelt [Liehr (1997)]. Es gibt jedoch auch Untersuchungen, in denen 4-HO-E2 bzw. 4-HO-E1 die gleichen Affinitäten zum ER hatten wie E2 und eine reduzierte Dissoziationsrate, so dass sie sogar länger an ihm gebunden sein könnten als das E2. Zur Estrogenität der CEs wurden viele *in vitro* bzw. *in vivo* Untersuchungen durchgeführt, wobei in der Regel 4-HO-E2 potenter war als 2-HO-E2 [Zhu und Conney (1998a)]. 4-HO-CEs stimulierten das Wachstum von humanen Brustkrebszellen (MCF-7), wobei die Stimulierung bei 4-HO-E2 stärker war als bei 4-HO-E1 [Mueck und Seeger (2007)]. In Tumormodellen waren 4-HO-CEs kanzerogen und führten zu Nierentumo-

ren im Hamster sowie zu Lebertumoren in Ratten und Mäusen, während 2-HO-CEs, obwohl sie *in vitro* auch reaktiv und genotoxisch sind, keine Tumoren induzierten [Liehr et al. (1986); Mueck und Seeger (2007)]. Der Mechanismus für die ausbleibende kanzerogene Wirkung der an Position 2 hydroxylierten Estrogenmetaboliten ist noch nicht vollständig geklärt [Liehr et al. (1986); Zhu und Conney (1998a)]. In humanem Brusttumorgewebe wurde viermal mehr 4-HO-E2 als in normalem Brustgewebe detektiert. Außerdem wurde in diesem Tumorgewebe dreimal mehr 4-HO-E2 als 2-HO-E2 nachgewiesen. Im Tumorgewebe wurden auch etwas weniger Methylierungsprodukte der CEs gefunden, was darauf hinweisen könnte, dass in diesen Brusttumoren der Phase II-Metabolismus nicht so stark ausgeprägt war [Rogan et al. (2003)]. Ebenso zeigten verschiedene Studien, dass gesteigerte Raten der 2-Hydroxylierung bei gleichbleibender 4-Hydroxylierungsrate einen Schutz gegen Estrogen-assoziierte Tumoren darstellen könnten [Zhu und Conney (1998a)].

1.1.4. Der Nachweis von DNA-Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden

DNA-Strangbrüche und oxidative Schäden an der DNA entstehen u.a. durch ROS (s. 1.1.3). Um eine Zelle oxidativem Stress auszusetzen, gibt es verschiedene Möglichkeiten, z.B. die Einwirkung erhöhter O_2 -Konzentrationen, Inkubationen mit H_2O_2 bzw. mit organischen Hydroperoxiden (z.B. tertiär-Butylhydroperoxid, t-BuOOH) oder mit Substanzen, deren Metabolismus durch die Zelle in einer gesteigerten Generierung von Superoxidradikalen und H_2O_2 resultiert, wie z.B. das Chinon Menadion [Aherne und O'Brien (2000b); Halliwell und Aruoma (1991)]. Aus diesem Grund stellen Menadion, H_2O_2 oder auch t-BuOOH sehr gute Positivkontrollen dar.

DNA-Strangbrüche können u.a. mit der Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) oder auch, wie bei dieser Arbeit, mit der Methode der alkalischen Entwindung (Alkaline Unwinding, AU) nachgewiesen werden. Hierbei wird die geschädigte DNA durch Zugabe einer alkalischen Lösung entwunden. Nach einer definierten Zeit erfolgt die Rückneutralisation mit Salzsäure sowie eine Ultraschallbehandlung zur Fragmentierung der DNA-Stränge. Dabei entstehen sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA-Bruchstücke, wobei die Einzelstränge aus den DNA-Abschnitten mit Einzelstrangbrüchen hervorgehen, welche durch Substanzinkubation induziert wurden. Die erhaltenen einzel- bzw. doppelsträngigen DNA-Bruchstücke werden mit einer Hydroxyl-

apatit (HA)-Chromatographie getrennt und fluorimetrisch detektiert [Hartwig et al. (1993)].

Für die Messung der oxidativen Schäden stehen auch verschiedene Methoden zur Verfügung, wie z.B. die Messung von 8-Hydroxyguanin mittels HPLC und elektrochemischer Detektion oder die GC/MS-Analyse [Halliwell und Aruoma (1991)]. Eine andere Möglichkeit der Analyse von DNA-Schäden durch ROS stellen gereinigte Reparaturenzyme in Kombination mit Tests dar, die DNA-Einzelstrangbrüche nachweisen können. In dieser Arbeit wurden die oxidativen DNA-Schäden von dem bakteriellen DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg) erkannt und mit der Technik der AU analysiert. Dieses aus *Escherichia coli* isolierte Protein weist verschiedene enzymatische Aktivitäten auf: eine N-Glykosylase-, AP-Lyase-, und eine 5'-terminale Desoxyribosephosphatase-Aktivität. Es erkennt neben 8-Hydroxyguanin auch imidazolringoffene Purine (2, 6-Diamino-4-Hydroxy-5-Formamidopyrimidine bzw. 4, 6-Diamino-5-Formamidopyrimidine), eine geringe Menge an 8-Hydroxyadenin sowie die daraus resultierenden apurinen/apyrimidinen Stellen und wandelt diese in Strangbrüche um. Diese DNA-Strangbrüche werden dann mittels AU detektiert [Hartwig et al. (1996); Tchou et al. (1994)].

1.1.5. Liposomen als Träger reaktiver Catechole

Substanzen mit einer Catecholstruktur (d.h. mit einer *ortho*-Diphenol-Gruppe) sind weit verbreitet. Beispiele hierfür sind die beschriebenen endogenen CEs oder auch Pflanzeninhaltsstoffe wie das Flavonol Quercetin. Gewöhnlich sind Catechole chemisch und metabolisch instabil, und zahlreiche Reaktionen mit ihnen sind bekannt, die zum Teil zu toxischen Effekten führen, wie z.B. das beschriebene Redoxcycling (s. 1.1.2) oder die Komplexbildung mit Metallionen [Schweigert et al. (2001)]. Aufgrund ihrer Instabilität und ihrer geringen Lipophilie, welche die Diffusion durch Zellmembranen verhindert, ist davon auszugehen, dass die Konzentration von Catecholen in Zellen bei *in vitro* Inkubationen mit diesen Substanzen sehr gering ist. Um die Konzentration von Catecholen in Zellen zu erhöhen, wurden in dieser Arbeit Liposomen eingesetzt. Diese finden häufig Anwendung als Modellmembranen bzw. Arzneimittelträger in der Pharmazie. Durch ihre Verwendung soll eine verbesserte bzw. gezieltere Aufnahme von Medikamenten in bestimmte Gewebe bzw. ein verzögerter Metabolismus des Pharmakons erreicht werden [Torchilin und Weissig (2003)].

Liposomen sind kugelförmig und bestehen aus einer oder mehreren konzentrischen Lipiddoppelschichten mit wässrigem Innenraum. Sie werden in der Regel durch me-

chanische Verteilung von Phospholipiden in wässriger Lösung hergestellt. Phospholipide stellen Amphiphile dar, eine Gruppe oberflächenaktiver Substanzen, die eine hydrophile und eine hydrophobe Komponente im Molekül enthalten. Diese formen sich zu Lipiddoppelschichten aus, wobei u.a. durch Behandlung mit Ultraschall eine kolloidale Dispersion von ungefähr gleich großen geschlossenen Vesikeln entsteht, in der die hydrophilen Gruppen der Phospholipide in Kontakt mit der wässrigen Lösung stehen. Je nach Dauer der Ultraschallbehandlung können Liposomen unterschiedlicher Größe hergestellt werden. Man unterscheidet dabei große unilamellare Vesikel (large unilamellar vesicles, LUVs) bzw. kleine unilamellare Vesikel (small unilamellar vesicles, SUVs) sowie große multilamellare Vesikel (multilamellar vesicles, MLVs). Da die Phospholipide sich nicht in Wasser lösen, werden sie zuerst in einem organischen Lösungsmittel gelöst und das Lösungsmittel mit dem Rotationsverdampfer entfernt. Dabei entsteht ein dünner Lipidfilm, der in eine wässrige Lösung aufgenommen werden kann (Thin-Layer-Methode) [Lasic (1995); Torchilin und Weissig (2003)]. Werden Liposomen mit polaren Substanzen beladen, kann dadurch der Eintritt dieser Substanzen in Zellen verbessert werden. Die Interaktionen zwischen Liposomen und Zellen werden in 3 Kategorien eingeteilt:

1. Austausch von Proteinen und Lipiden mit Zellmembranen nach Adsorption der Liposomen an die Zellmembran.
2. Internalisierung der Liposomen an der Zellmembran durch Endo- bzw. Phagocytose.
3. Fusion der gebundenen Liposomen mit der Zellmembran.

Bei der Aufnahme durch Adsorption wird das Liposom an die Zelle adsorbiert, wobei es die enthaltene Substanz extrazellulär abgibt. Diese wird anschließend durch aktiven oder passiven Transport in die Zelle aufgenommen. Wird das Liposom von der Plasmamembran umhüllt und als Vesikel (Endosom) in das Zellinnere befördert, spricht man von Endocytose. In der Zelle verschmilzt es mit den Lysosomen, welche die zum Abbau des Endosoms erforderlichen Enzyme enthalten. Dabei kommt es dann zur Abgabe der eingeschlossenen Substanz in das Cytosol. Die dritte Aufnahmeart stellt die Fusion der Liposomenmembran mit der Plasmamembran dar, wobei dabei die Substanz aus dem Liposom direkt ins Cytosol abgegeben wird. Welche Interaktionen ablaufen, kommt auf die Lipidzusammensetzung, die Größe bzw. die Ladung der Liposomen, den Zelltyp bzw. die Rezeptorausstattung der Zellmembran und viele andere Parameter an [Lasic (1995); Torchilin und Weissig (2003)].

1.2. Die Isoflavone Daidzein und Genistein

Epidemiologische und experimentelle Studien weisen darauf hin, dass Sojaprodukte das Krebsrisiko mindern können. Außerdem werden ihnen noch andere positive Eigenschaften zugesprochen, wie die Senkung des Cholesterinspiegels bzw. des Blutdruckes, die Vorbeugung kardiovaskulärer Erkrankungen oder Osteoporose [Knight und Eden (1996); Kulling et al. (2000); Lamartiniere et al. (2002); Nagata et al. (2002)]. Daidzein und Genistein, deren Strukturformeln in Abbildung 1.10 gezeigt werden, stellen Isoflavone dar, welche hauptsächlich in Sojaprodukten, aber auch in anderen Pflanzen, enthalten sind [Kulling et al. (2000); Murata et al. (2004)].

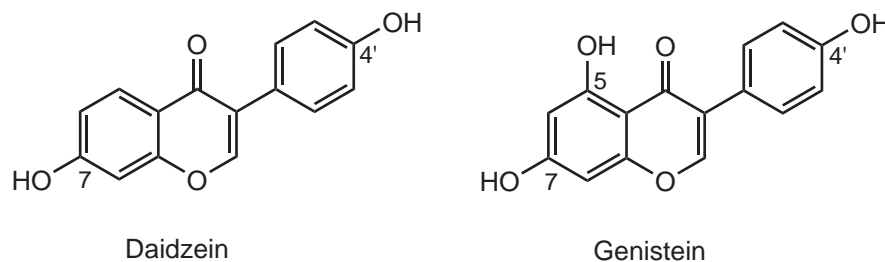


Abbildung 1.10.: Strukturformeln der Isoflavone Daidzein und Genistein.

In Sojabohnen und in nicht-fermentierten Sojaprodukten kommen die Isoflavone überwiegend verestert in Form von Glucosiden (Daidzin bzw. Genistin) vor, während in fermentierten Sojaprodukten die Aglykone dominieren. Vor ihrer Resorption im Darm werden die Glucoside durch Darmbakterien hydrolysiert, um dann als Daidzein bzw. Genistein mittels passiver Diffusion in den Körper aufgenommen zu werden. Eine Spaltung kann ebenfalls durch eine unspezifische, cytosolische Glucosidase des Dünndarms erfolgen. Es ist aber auch möglich, dass nicht-hydrolysierte Isoflavonglucoside über einen Glucose-Transporter von den Enterozyten aufgenommen werden, analog zu anderen Flavonoiden wie z.B. Quercetin [Kulling (2002)].

Nach ihrer Resorption werden die Isoflavone bereits in den Darmenterozyten oder in der Leber wieder konjugiert. Dabei wird der Glucuronidierung die größte Bedeutung zugesprochen [Kulling et al. (2000); Zhang et al. (2003)]. Aufgrund ihrer Strukturen (s. 1.10) ist eine Glucuronidierung an Position 4' bzw. 7 denkbar. Genistein kann zusätzlich noch an Position 5 glucuronidiert werden. Es zeigte sich, dass die Glucuronidierung vor allem an Position 7 stattfand. Position 4' spielte eine größere Rolle bei der Sulfatierung [Chen et al. (2005a)]. Für die Glucuronidierung der beiden Isoflavone sind verschiedene UGTs zuständig (UGT1A1, 1A4, 1A6, 1A7, 1A9, 1A10).

Die UGT1A10-Isoform des Gastrointestinaltraktes scheint jedoch spezifisch für die Glucuronidierung von Genistein zu sein [Doerge et al. (2000); Zhang et al. (2003)]. Außerdem stellen die Isoflavone ausgezeichnete Substrate für CYPs dar. Dabei werden verschiedene oxidative Metaboliten gebildet, die größtenteils Catechol- bzw. Pyrogallolstruktur besitzen [Kulling et al. (2000)]. Diese Metaboliten wurden zum Teil in humanem Urin nachgewiesen. Obwohl die Metaboliten mit Catecholstruktur Substrate für die COMT darstellen, wurden in humanem Urin nur geringe Mengen der Metaboliten als Methoxyderivate detektiert [Kulling et al. (2001)].

Die beiden Isoflavone Daidzein und Genistein sind Liganden des ER. Ihre estrogenen Effekte sind jedoch ungefähr 10000-fach schwächer verglichen mit E2 [Bianco et al. (2005)]. Sie konkurrieren folglich mit den Estrogenen um die Bindungsstelle des ER, was u.a. als Mechanismus für die antiestrogene Wirkung der Isoflavone diskutiert wird. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass sie in den Metabolismus der Estrogene eingreifen [Cohen et al. (2007)] und darüber die intrazelluläre Konzentration an endogenen Estrogenen vermindern.

Aufgrund der genannten positiven Eigenschaften dieser Phytoestrogene stieg der Konsum von Sojaprodukten und die Supplementation mit Isoflavonen (vor allem in Amerika) in den letzten Jahren an [Messina et al. (2006)]. Dies könnte durchaus problematisch sein, da verschiedene Untersuchungen an Nagern zeigten, dass höhere Konzentrationen an Genistein und/oder Daidzein Tumoren in den weiblichen Fortpflanzungsorganen, wie z.B. der Gebärmutter und der Vulva, induzierten [Murata et al. (2004)]. Außerdem wurde das Wachstum von Brustkrebszellen in Mäusen gesteigert bzw. die Tumorraten im Kolon von Ratten in Anwesenheit von Genistein erhöht [Allred et al. (2001); Rao et al. (1997)]. In *in vitro* Studien induzierte Genistein, aber nicht Daidzein, DNA-Strangbrüche in Fibroblasten des Chinesischen Hamsters (V79), und beim Mikrokerntest konnte eine klastogene Wirkung des Genisteins nachgewiesen werden. Daidzein zeigte hingegen keinen bzw. einen geringen Effekt [Di Virgilio et al. (2004); Kulling und Metzler (1997); Kulling et al. (1999)]. Vermutet wird, dass hierbei u.a. ihre oxidativen Metaboliten eine Rolle spielen. Wie bereits erwähnt, stellen diese zum Teil Catechole dar, die wie die CEs zu Chinonen oxidiert werden und so zur Initiation von Tumoren beitragen könnten (s. 1.1.2 und 1.1.3) [Murata et al. (2004)].

2. Problemstellung

Das körpereigene Steroidhormon 17 β -Estradiol (E2) spielt bei hormonabhängigen Krebserkrankungen, wie Brust-, Uterus- und Prostatatumoren, eine bedeutende Rolle. Erhöhte E2-Konzentrationen sowohl im Plasma als auch im Gewebe über einen längeren Zeitraum steigern das Risiko für die genannten Krankheiten. Neben der Estrogenrezeptor-vermittelten Stimulierung der Zellproliferation wird dem Metabolismus von E2 zu reaktiven Metaboliten eine große Bedeutung bei der Entstehung hormonabhängiger Tumoren zugesprochen.

E2 wird im Körper enzymatisch zu Estron (E1) und den Catecholestrogenen (CEs) 2-HO-E2, 2-HO-E1, 4-HO-E2 sowie 4-HO-E1 oxidiert. Dieser oxidative Metabolismus von E2 führt jedoch nicht zur Inaktivierung, da reaktive Catechole entstehen, die über die Oxidation zu Semichinonen bzw. Chinonen und anschließendem Redoxcycling reaktive Sauerstoffspezies bilden können und deshalb genotoxisches Potential besitzen. Außerdem gelten die Catechole 4-HO-E2 und 4-HO-E1 als kanzerogen, während vor allem das methylierte 2-HO-E2, 2-MeO-E2, protektive Eigenschaften hat. Die Methylierung ist, neben der Glucuronidierung, Teil des Phase II-Metabolismus und bezüglich der CE-Inaktivierung sehr wichtig. Zur Glucuronidierung der vier CEs fehlen vergleichende Untersuchungen, obwohl einzig die Glucuronidierung zur Ausschleusung von E2 und seinen Metaboliten aus der Zelle führt.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Phase II-Metabolismus von E2 sowie von seinen reaktiven Metaboliten, den CEs, *in vitro* untersucht werden. Neben Untersuchungen mit verschiedenen Zellfraktionen sollte der Phase II-Metabolismus auch in intakten Zellen analysiert werden. Es sollte der Einfluss exogener Faktoren, wie z.B. der Isoflavone Daidzein bzw. Genistein, welche hauptsächlich mit Sojaprodukten in den Körper aufgenommen werden, und endogener Faktoren, z.B. der Estrogene selbst, auf den Phase II-Metabolismus von E2 sowie der CEs ermittelt werden. Weiterhin sollte der Zusammenhang zwischen dem Phase II-Metabolismus der CEs und der Genotoxizität dieser reaktiven E2-Metaboliten untersucht werden.

3. Ergebnisse

3.1. Die Glucuronidierung von E2 in verschiedenen biologischen Systemen

3.1.1. Untersuchungen mit Humanlebermikrosomen

Wurde E2 mit Humanlebermikrosomen (HLM) in Anwesenheit von UDPGA glucuronidiert (Durchführung s. 6.2.4.1), konnten mittels HPLC-Analyse zwei Glucuronide detektiert werden. Anhand von Cochromatographie mit Referenzsubstanzen wurden diese als E2-3-G und E2-17-G identifiziert, wobei E2-3-G vorrangig gebildet wurde. Wie in 1.1.1.3 bereits beschrieben, wird die Bildung dieser beiden Glucuronide von unterschiedlichen UGTs katalysiert. Während das E2-17-G in der humanen Leber bevorzugt von UGT2B7, unter geringer Beteiligung z.B. von UGT1A3, gebildet wird, katalysiert UGT1A1 in der Leber spezifisch die E2-Glucuronidierung an Position 3. Untersuchungen der Kinetiken, die der Bildung der Glucuronide mit HLM zugrunde liegen, zeigten, dass die E2-17-Glucuronidierung der Michaelis-Menten-Kinetik unterliegt, während die E2-3-G-Bildung der Hill-Kinetik folgt, was aus einer homotropen Aktivierung von UGT1A1 durch E2 selbst resultiert [Alkharfy und Frye (2002); Fisher et al. (2000); Pfeiffer et al. (2005)].

In dieser Arbeit wurden die kinetischen Profile sowie die kinetischen Parameter der E2-Glucuronidierung mit HLM (0,25 - 0,5 mg Protein/ml) bestimmt. Dabei wurden E2-Konzentrationen von 5 - 150 μ M eingesetzt. Die Inkubationszeiten betrugen zwischen 10 und 30 Min. Die Ermittlung des kinetischen Profils bzw. der kinetischen Kenngrößen fand nach 6.2.4.5 statt. Wie Tabelle 3.1 zeigt, konnte für die E2-3-Glucuronidierung die Hill-Kinetik sowie für die E2-17-Glucuronidierung die Michaelis-Menten-Kinetik bestätigt werden. Vergleicht man die Bildung des E2-3-G mit der des E2-17-G wird deutlich, dass bei der Glucuronidierung an Position 3 eine wesentlich höhere v_{\max} erreicht werden kann als bei der E2-17-Glucuronidierung. Auch die CL_{int} der E2-3-Glucuronidierung ist höher als bei der E2-17-Glucuronidierung. Die

Michaelis-Menten-Konstante (K_m) bzw. die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit ($K_{0,5}$) geben Hinweise für die Affinität des Substrates zum Enzym. Eine kleinere K_m , wie es bei der Bildung des E2-17-G der Fall ist, zeigt eine höhere Affinität zum Enzym. Der Hill-Koeffizient (n) stellt bei der Hill-Kinetik ein mathematisches Instrument dar, das den Grad der Sigmoidität aufzeigt [Tracy und Hummel (2004); Williams et al. (2002)].

Tabelle 3.1.: Kinetische Parameter der Glucuronidierung von E2. A, Aktivierungskinetik (Hill-Kinetik); MM, Michaelis-Menten-Kinetik; G, Glucuronid; v_{max} , maximale Geschwindigkeit; K_m ($K_{0,5}$), Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit; n , Hill-Koeffizient; CL_{int} , intrinsische Clearance; P., Protein.

	Kinetik	v_{max} (pmol/(Min x mg P.))	K_m ($K_{0,5}$) (μ M)	n (μ M)	CL_{int} (μ l/(Min x mg P.))
3-G	A	1100	29	1,7	$20 \pm 4,7$
17-G	MM	180	11	1	$17 \pm 3,5$

3.1.1.1. Einfluss der Isoflavone Daidzein und Genistein auf die Glucuronidierung von E2

Wenn das E2 selbst seine Glucuronidierung an Position 3 aktivieren kann, stellt sich die Frage, ob auch andere Substanzen in der Lage sind, in die Glucuronidierung von E2 einzugreifen. Da verschiedene Nahrungsmittelinhaltsstoffe, wie u.a. die Isoflavone Daidzein und Genistein, Substrate von UGT1A1 darstellen, wurde ihr Einfluss auf die Glucuronidierung von E2 untersucht (Durchführung s. 6.2.4.1). Die Bedingungen der Glucuronidierung mit HLM und UDPGA als Cosubstrat wurden so gewählt, dass im linearen Bereich der UGTs gearbeitet wurde. In Abbildung 3.1 ist die katalytische Aktivität, d.h. die Geschwindigkeit der E2-3-G-Bildung, in Ab- oder Anwesenheit von Daidzein bzw. Genistein dargestellt. Es konnte nachgewiesen werden, dass 25μ M E2 mit einer Aktivität von 544 ± 22 pmol/(Min x mg Protein) zum E2-3-G umgesetzt wurden bzw. mit einer Aktivität von 126 ± 4 pmol/(Min x mg Protein) zum E2-17-G. Die Konzentration von 25μ M wurde so gewählt, dass sie nahe an der Konzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit der E2-3-G-Bildung ($K_{0,5} = 29,0 \pm 3,7 \mu$ M) liegt (s. Tabelle 3.1). In Anwesenheit von Daidzein (25μ M) konnte die Glucuronidierung von E2 zum E2-3-G um $\sim 50\%$ gesteigert werden, während die Glucuronidierung

zum E2-17-G um $\sim 15\%$ gehemmt wurde. Eine Erhöhung der Glucuronidierungsrate von E2 ($25\text{ }\mu\text{M}$) an Position 3 durch Daidzein wurde im Konzentrationsbereich zwischen 5 und $50\text{ }\mu\text{M}$ erreicht, wobei die Steigerung bei $25\text{ }\mu\text{M}$ Daidzein am größten war. Daidzeinkonzentrationen $> 50\text{ }\mu\text{M}$ hemmten die E2-3-G-Bildung. E2-Konzentrationen $> 25\text{ }\mu\text{M}$ führten, bei gleichbleibender Daidzeinkonzentration ($25\text{ }\mu\text{M}$), zu einer geringeren Aktivierung von UGT1A1. Bei Reduktion der E2-Konzentration konnte die Steigerung der E2-3-G-Bildung noch weiter erhöht werden und erreichte bei $5\text{ }\mu\text{M}$ nahezu 100% (Daidzeinkonzentration $25\text{ }\mu\text{M}$) [Pfeiffer et al. (2005)]. Beim Einsatz des Isoflavons Genistein ($25\text{ }\mu\text{M}$) wurde eine starke Hemmung der E2-3-Glucuronidierung nachgewiesen, die E2-17-Glucuronidierung blieb nahezu unbeeinflusst (Abbildung 3.1).

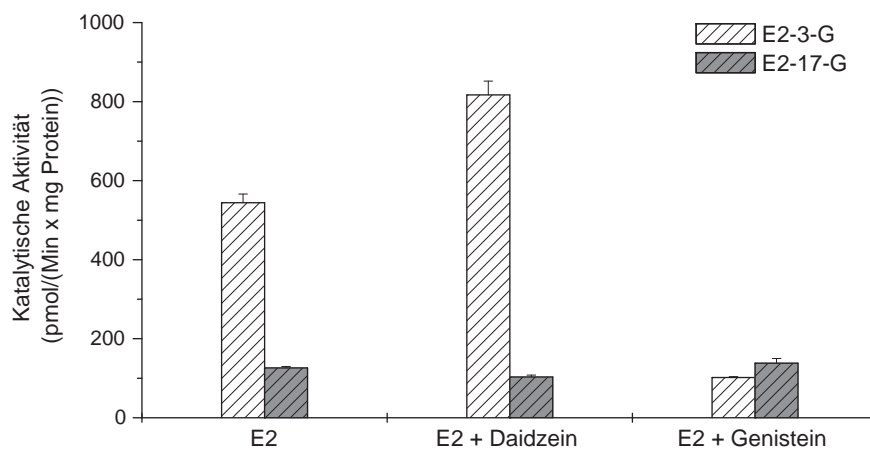


Abbildung 3.1.: Einfluss von Daidzein und Genistein ($25\text{ }\mu\text{M}$) auf die Glucuronidierung von E2 ($25\text{ }\mu\text{M}$) mit HLM ($0,5\text{ mg Protein/ml}$). Die Inkubationszeit betrug 30 Min. Die abgebildeten Werte repräsentieren Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SA) von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.1.2. Einfluss oxidativer E2-Metaboliten auf die Glucuronidierung von E2

Exogene Substanzen, wie das Isoflavon Daidzein, sind demnach in der Lage, unter den gewählten Bedingungen, die Glucuronidierung von E2 mit HLM zu modulieren. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden oxidative Metaboliten des E2 (die CE, ihre Methylierungsprodukte sowie E3) auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Glucuronidierung von E2 zu beeinflussen. Dazu wurde die katalytische Aktivität der E2-3-Glucuronidierung in Anwesenheit der verschiedenen Metaboliten bestimmt und ebenfalls mit der er-

haltenen Geschwindigkeit ohne Zusatz eines Metaboliten verglichen (Abbildung 3.2). Wiederum wurde für das E2 sowie für die verschiedenen Metaboliten bei den Glucuronidierungen mit UDPGA eine Konzentration von 25 μM eingesetzt. Daidzein wurde in diesem Experiment als Kontrolle für eine Steigerung der E2-3-Glucuronidierung mitgeführt. Wie in Abbildung 3.2 gezeigt, konnte für keines der CEs eine Aktivierung der E2-3-Glucuronidierung nachgewiesen werden. Alle vier CEs hemmten die E2-3-Glucuronidierung zwischen 40 und 60%. Bei den Methylierungsprodukten der CEs wurden exemplarisch 2-MeO-E2 bzw. 4-MeO-E2 eingesetzt. Während 2-MeO-E2 keinen Effekt auf die Glucuronidierung von E2 hatte, konnte beim Einsatz von 4-MeO-E2 wiederum eine Hemmung gemessen werden. E3 zeigte keine Beeinflussung der E2-3-Glucuronidierung mit HLM.

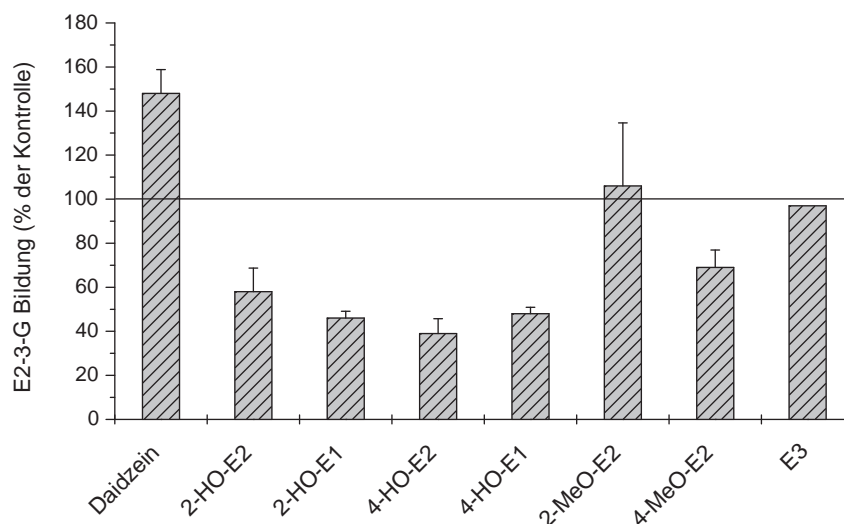


Abbildung 3.2.: Einfluss von Daidzein sowie verschiedener E2-Metaboliten auf die E2-3-Glucuronidierung mit HLM (0,5 mg Protein/ml). Die eingesetzte Konzentration betrug bei allen Substanzen 25 μM , die Inkubationszeit 30 Min. Die bei Anwesenheit von Daidzein bzw. des jeweiligen Metaboliten erhaltene katalytische Aktivität wurde auf die katalytische Aktivität der E2-3-Glucuronidierung ohne Daidzein bzw. Metabolit bezogen. Die abgebildeten Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SA}$ von drei unabhängigen Experimenten.

Einfluss von Daidzein auf die Glucuronidierung von E2-Metaboliten

Die Anwesenheit von Daidzein beeinflusste die E2-3-Glucuronidierung. Deshalb wurde zusätzlich der Effekt von Daidzein (25 μ M) auf die Glucuronidierung der CEs sowie ihrer Methylierungsprodukte (25 μ M) untersucht. Exemplarisch wurde dieser Versuch mit zwei CEs, 2-HO-E2 und 4-HO-E2, durchgeführt. Um den Einfluss von Daidzein auf die Glucuronidierung der Methoxyderivate der CEs zu bestimmen, diente 2-MeO-E2 als Substrat. Auch hier wurde noch einmal die Glucuronidierung von E2 in Anwesenheit von Daidzein durchgeführt, um die Richtigkeit des Systems sicherzustellen. Bei den drei eingesetzten E2-Metaboliten konnte in den sauren Extrakten der Umsetzungen mit HLM und UDPGA als Cosubstrat jeweils ein Glucuronid mittels HPLC-Analyse und UV-Detektion nachgewiesen werden. Die genaue Position der Glucuronsäure konnte nicht bestimmt werden, da keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen. Es ist jedoch zu vermuten, dass es nicht Position 17 war, da auch Lepine et al. (2004) in ihren Untersuchungen mit humanen rekombinanten UGTs keine Glucuronide an Position 17 der CEs nachweisen konnten. Zusätzlich zeigten Lepine et al. (2004), dass die 2-HO-CEs vorwiegend an Position 3 und die 4-HO-CEs hauptsächlich an Position 4 glucuronidiert wurden. Das Ergebnis der Glucuronidierungen ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

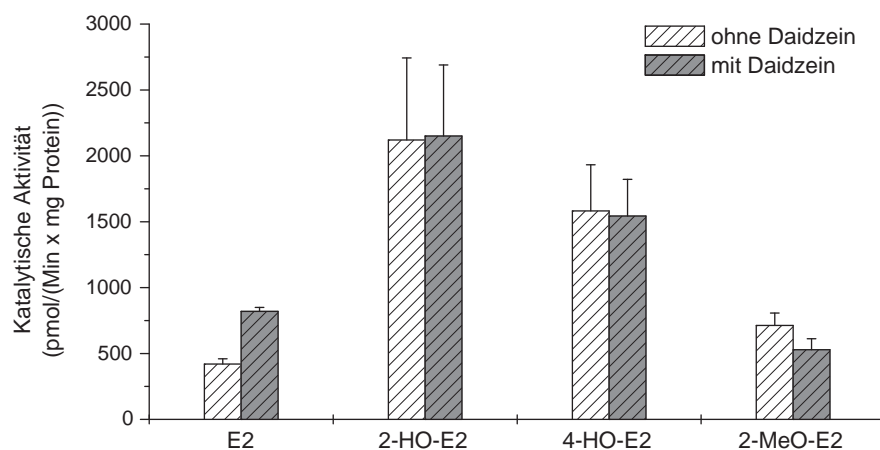


Abbildung 3.3.: Einfluss von Daidzein auf die E2-3-Glucuronidierung bzw. auf die Glucuronidierung der E2-Metaboliten mit HLM (0,5 mg Protein/ml). Die eingesetzte Konzentration betrug bei allen Substanzen 25 μ M, die Inkubationszeit 30 Min. Die abgebildeten Werte repräsentieren $MW \pm SA$ von drei unabhängigen Experimenten.

Die katalytischen Aktivitäten der 2-HO-E2- bzw. 4-HO-E2-Glucuronidierung waren gleich hoch, unabhängig davon, ob Daidzein anwesend war oder nicht. Die Glucuronidierung von 2-MeO-E2 wurde durch Daidzein vermindert.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen mit HLM, dass, neben dem E2 selbst, nur das Isoflavon Daidzein, nicht aber Genistein oder E2-Metaboliten, in der Lage war, die Glucuronidierung von E2 an Position 3 zu steigern. Dieser Effekt war für die E2-3-Glucuronidierung spezifisch und konnte weder für die Bildung des E2-17-G noch für die Glucuronidierung der eingesetzten E2-Metaboliten bestätigt werden.

3.1.2. Untersuchungen mit Rattenleber- und Rattennierenmikrosomen

Um die homotrope bzw. heterotrope Aktivierung der E2-3-Glucuronidierung in intakten Zellen nachweisen zu können, sollte ein geeignetes Testsystem gefunden werden. Eine Möglichkeit stellen dabei u.a. Präzisionsgewebeschnitte der Rattenleber oder Rattenniere dar. Die Glucuronidierung von E2 (25 μ M) wurde zunächst mit Mikrosomen dieser beiden Gewebe untersucht, um festzustellen, ob Rattenlebermikrosomen (RLM) und -nierenmikrosomen (RNM) vergleichbare Ergebnisse liefern wie HLM.

In Abbildung 3.4 sind die erhaltenen katalytischen Aktivitäten der E2-Glucuronidierung mit RLM und RNM im Vergleich zu den Ergebnissen mit HLM (s. auch Abbildung 3.1) dargestellt. Die Glucuronidierungen wurden im linearen Bereich der UGTs durchgeführt (s. Abbildung 3.5). Mit RLM überwog die E2-17-Glucuronidierung, wohingegen mit RNM fast ausschließlich E2-3-G gebildet wurde. Die UGT1A1-Isoform der Ratte ist sehr homolog zu dem humanen UGT1A1-Isoenzym, welches die E2-3-Glucuronidierung in der Humanleber katalysiert. Außerdem besitzen die beiden Isoenzyme ähnliche Substratspezifitäten [King et al. (1996, 2000)]. Nach Shelby et al. (2003) ist der mRNA-Anteil an UGT1A1 in der Rattenniere, verglichen mit demjenigen anderer UGT-Isoenzymen, sehr groß. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass in der Ratte ebenfalls vor allem das Isoenzym UGT1A1 an der Bildung des E2-3-G beteiligt ist. Für die Glucuronidierung des E2 an Position 17 sind in der Ratte vor allem UGT2B1 und 2B3 verantwortlich [Mackenzie et al. (1992)]. Die mRNA-Gehalte dieser beiden Isoformen sind in der Rattenniere sehr gering [Shelby et al. (2003)], was sich in dem niedrigen Anteil an E2-17-G widerspiegelt. Somit ähneln die RNM in ihrer Eigenschaft, E2 zu glucuronidieren den HLM, wenngleich die katalytischen Aktivitäten etwas niedriger waren als mit HLM. Sie wurden deshalb für weitere Untersuchungen den RLM vorgezogen.

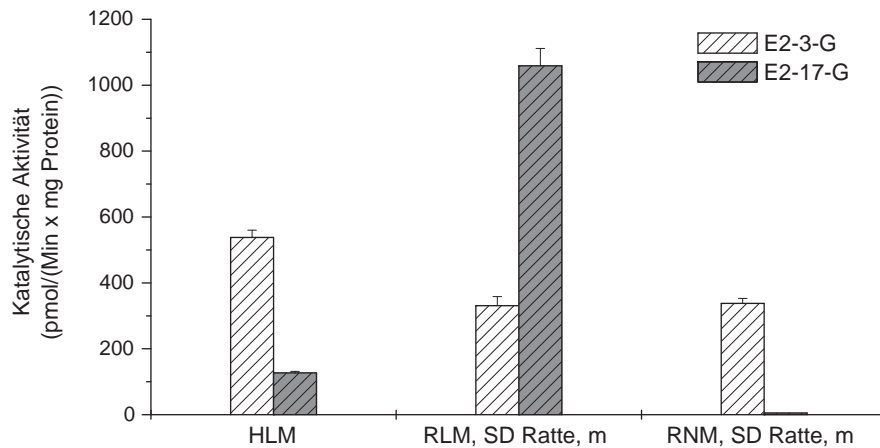


Abbildung 3.4.: Glucuronidierung von E2 mit HLM, RNM und RLM ($c(E2) = 25 \mu M$, Proteingehalt: 0,5 mg/ml, Inkubationszeit: 30 Min). Die abgebildeten Werte repräsentieren $MW \pm SA$ von drei unabhängigen Experimenten. SD, Sprague-Dawley; m, männlich.

3.1.2.1. Bestimmung der Kinetik der E2-3-Glucuronidierung mit RNM

Um die RNM hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit zu den HLM noch genauer zu charakterisieren, wurde die Kinetik, die der E2-3-Glucuronidierung mit RNM zugrunde liegt, bestimmt. Die Kenntnis der Kinetik ist wichtig, da nur die Hill-Kinetik eine homotrope bzw. heterotrope Aktivierung der E2-3-Glucuronidierung erlaubt (s. 3.1.1 bzw. 3.1.1.1).

Zuerst wurde der lineare Bereich der an der E2-3-Glucuronidierung beteiligten UGTs in RNM abgegrenzt, damit bei den folgenden Experimenten ausgeschlossen werden konnte, dass die UGTs bereits mit Substrat gesättigt sind. Zur Bestimmung des linearen Bereiches wurde E2 unterschiedlich lange mit RNM glucuronidiert (Durchführung s. 6.2.4.1) und die jeweilige katalytische Aktivität für die E2-3-Glucuronidierung berechnet. Die eingesetzte E2-Konzentration betrug $100 \mu M$ und wurde deshalb für die Festlegung des linearen Bereiches verwendet, da sie bei der Bestimmung der Kinetik die höchste einzusetzende Konzentration darstellte. Zusätzlich wurde der Einfluss verschiedener Protein- und somit Enzymmengen auf die katalytische Aktivität untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.5 zu sehen. Es konnte festgestellt werden, dass der lineare Bereich der UGTs sehr klein ist und er sich außerdem mit zunehmender Enzymmenge weiter verkleinert. So war bei einem Proteingehalt von 0,5 mg/ml die

Bildung des E2-3-G bis 60 Min linear, bei 1, 25 mg/ml betrug der lineare Bereich noch 30 Min und bei einem Proteingehalt von 2, 5 mg/ml nur noch 15 Min. Die katalytische Aktivität im linearen Bereich konnte mit 511 ± 26 pmol/(Min x mg Protein) berechnet werden.

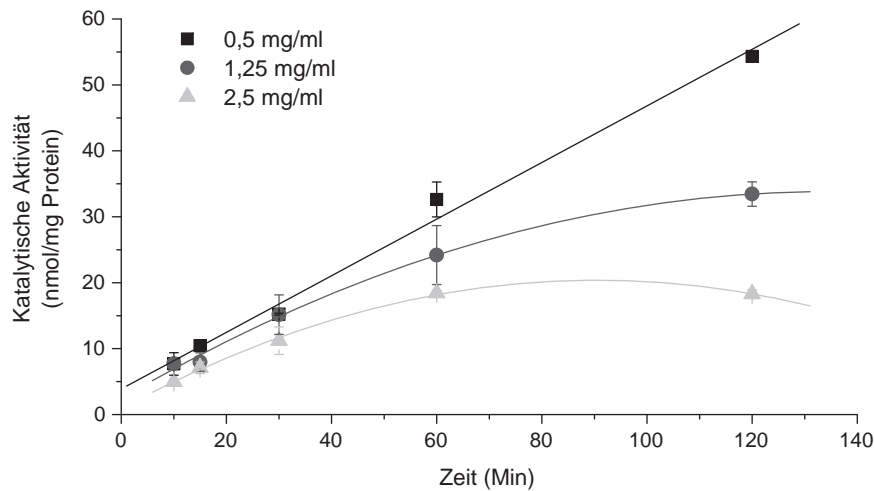


Abbildung 3.5.: Linearer Bereich der UGTs bei der E2-3-Glucuronidierung mit RNM. Die Linearität wurde bei unterschiedlichen Enzymmengen bzw. Inkubationszeiten zwischen 15 und 120 Min bestimmt ($c(E2) = 100 \mu M$). Die abgebildeten Werte repräsentieren $MW \pm$ Spannweite (SW) von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Untersuchung der Kinetik erfolgte nun durch die Glucuronidierung verschiedener E2-Konzentrationen ($5 - 100 \mu M$) mit RNM ($0,5$ mg Protein/ml) für 30 Min (Durchführung s. 6.2.4.1). Diese Bedingungen ermöglichten, dass die UGTs im linearen Bereich arbeiteten (s. Abbildung 3.5). Die Enzymaktivitäten wurden berechnet und gegen die jeweils eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen. Die zugrunde liegende Kinetik wurde nach 6.2.4.5 bestimmt. Abbildung 3.6 (links) zeigt, dass die Kurvenanpassung der Hill-Kinetik folgt und der für diese Kinetik charakteristische, sigmoidale Kurvenverlauf erkennbar ist. Trägt man auf der x-Achse nicht die Substratkonzentration, sondern den Quotienten aus der katalytischen Aktivität und der jeweils eingesetzten E2-Konzentration auf, erhält man die Darstellung nach Eadie-Hofstee, durch welche die Hill-Kinetik noch eindeutiger erkennbar ist (Abbildung 3.6, rechts). Die für die RNM ermittelten kinetischen Parameter sind in Tabelle 3.2 im Vergleich zu den kinetischen Daten der HLM dargestellt. Die Werte für v_{max} bzw. $K_{0,5}$ sind nur halb

so hoch wie die entsprechenden Werte mit HLM, während n und vor allem CL_{int} sehr gut den Parametern mit HLM entsprechen.

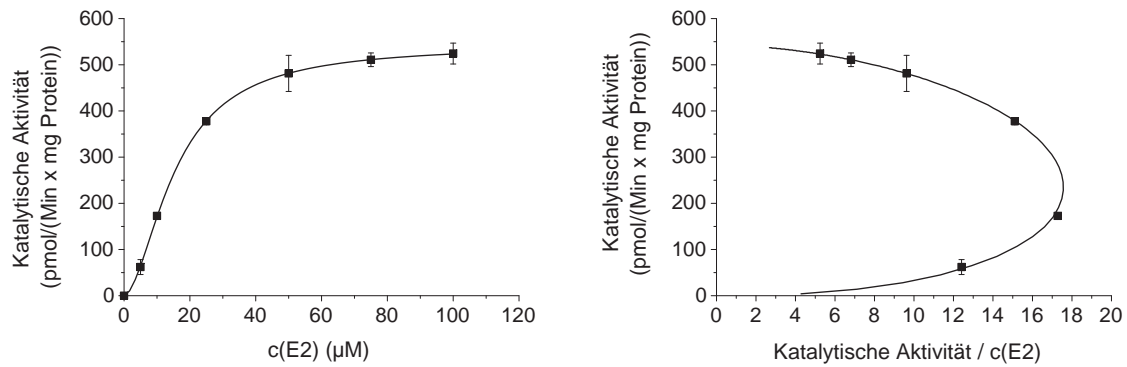


Abbildung 3.6.: Kinetisches Profil der E2-3-Glucuronidierung mit RNM (0,5 mg Protein/ml). Die Inkubationszeit betrug 30 Min. Die Kurvenanpassung folgte der Hill-Kinetik (links). Auf der rechten Seite ist der Eadie-Hofstee-Plot der Hill-Kinetik dargestellt. Die Datenpunkte repräsentieren $MW \pm SW$ aus zwei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 3.2.: Vergleich der kinetischen Parameter der E2-3-Glucuronidierung mit HLM und RNM. A, Aktivierungskinetik (Hill-Kinetik); v_{max} , maximale Geschwindigkeit; $K_{0,5}$, Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit; n , Hill-Koeffizient; CL_{int} , intrinsische Clearance; P., Protein.

Kinetik		v_{max} (pmol/(Min x mg P.))	$K_{0,5}$ (μM)	n	CL_{int} (μl /(Min x mg P.))
HLM	A	1100	29	1,7	20
RNM	A	543	16	1,8	18

Mit RNM folgte die E2-3-Glucuronidierung somit der Hill-Kinetik, und auch die berechneten kinetischen Parameter ähnelten denen mit HLM. Deshalb konnten die RNM, wie die HLM, für die Untersuchung der Beeinflussung der E2-Glucuronidierung durch Daidzein eingesetzt werden.

3.1.2.2. Einfluss von Daidzein auf die E2-Glucuronidierung mit RNM

Da mit HLM nur das Isoflavon Daidzein, nicht aber Genistein, in der Lage war, die E2-Glucuronidierung an Position 3 zu steigern, wurde mit RNM nur der Einfluss dieses Isoflavons auf die E2-Glucuronidierung untersucht.

20 μ M E2 wurden zusammen mit 20 μ M Daidzein glucuronidiert (s. 6.2.4.1) und mit der katalytischen Aktivität, die bei der E2-Glucuronidierung ohne Daidzein erhalten wurde, verglichen. Die Inkubationszeit betrug 30 Min. Der Proteingehalt wurde, im Vergleich zu den bisherigen Untersuchungen mit RNM, auf 1 mg/ml erhöht, um den Umsatz der Glucuronidierung zu steigern. Somit wurde sowohl im Bereich von $K_{0,5}$ (s. Tabelle 3.2) als auch im linearen Bereich der UGTs gemessen (s. Abbildung 3.5). Als Vergleich wurde die Glucuronidierung von E2 und Daidzein noch einmal mit HLM durchgeführt, um methodische Fehler auszuschließen. Da mit HLM $K_{0,5}$ höher liegt (s. Tabelle 3.2), wurden hier Substratkonzentrationen von 25 μ M (E2 bzw. Daidzein) gewählt. Der Proteingehalt betrug 0,5 mg/ml, die Inkubationszeit ebenfalls 30 Min. Eine heterotrope Aktivierung der Glucuronidierung von E2 in Anwesenheit von Daidzein konnte mit RNM jedoch unter diesen Bedingungen nicht gezeigt werden (Abbildung 3.7, links). Die katalytische Aktivität der beteiligten UGTs sank in Gegenwart von Daidzein von 229 ± 52 pmol/(Min x mg Protein) auf 81 ± 20 pmol/(Min x mg Protein), was $36 \pm 4\%$ der katalytischen Aktivität ohne Daidzein entspricht. Das E2-17-G wurde mit RNM kaum gebildet und deshalb bei der Auswertung nicht berücksichtigt (s. auch Abbildung 3.4). Mit HLM konnten die Ergebnisse von 3.1.1.1 bestätigt werden. Die Erhöhung der E2-3-Glucuronidierung betrug in dem einfach durchgeführten Kontrollversuch 45%, während die Bildung des E2-17-G um 15% vermindert wurde (Abbildung 3.7, links).

Betrachtete man die Daidzeinglucuronidierung, die an Position 7 bzw. 4' stattfinden kann (vgl. Abbildung 1.10), war zunächst erkennbar, dass mit RNM fast nur das Daidzein-7-Glucuronid gebildet wurde, während mit HLM zusätzlich das Daidzein-4'-Glucuronid entstand (Abbildung 3.7, rechts). Die Zuordnung der mittels HPLC erhaltenen Peaks zu den entsprechenden Glucuroniden fand anhand der Retentionszeiten und Literaturdaten statt [Doerge et al. (2000)]. Die katalytische Aktivität der Daidzeinglucuronidierung an Position 7 wurde mit RNM in Gegenwart von E2 von 361 ± 18 pmol/(Min x mg Protein) auf 320 ± 28 pmol/(Min x mg Protein) leicht vermindert, was einer Senkung um 11% entspricht. Mit HLM war die Abnahme der Glucuronidierung an Position 7 stärker, sie sank um 37% (von 954 pmol/(Min x mg Protein) auf 598 pmol/(Min x mg Protein)).

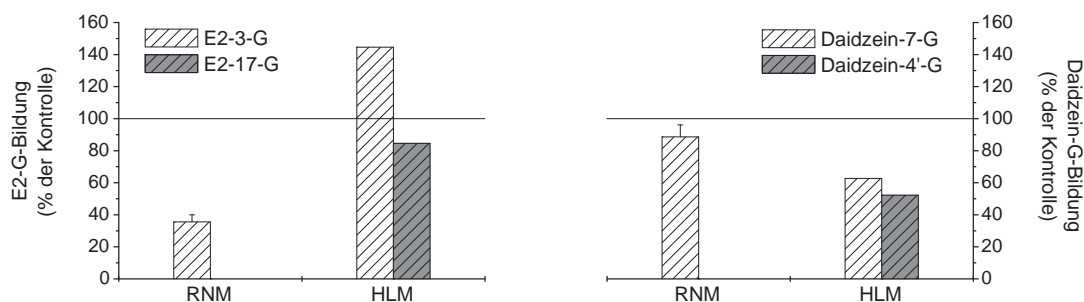


Abbildung 3.7.: Einfluss von Daidzein auf die E2-Glucuronidierung mit RNM (1 mg Protein/ml) und HLM (0,5 mg Protein/ml), links. Auf der rechten Seite wurde der Einfluss von E2 auf die Glucuronidierung von Daidzein in den Mikrosomen der genannten Spezies gegenüber gestellt. Mit RNM wurden jeweils 20 μM E2 bzw. Daidzein eingesetzt, mit HLM 25 μM . Die Inkubationszeit betrug 30 Min. Die bei Anwesenheit von Daidzein bzw. E2 erhaltene katalytische Aktivität wurde auf diejenige der E2-Glucuronidierung ohne Daidzein bzw. der Daidzeinglucuronidierung ohne E2 bezogen. Die abgebildeten Werte mit RNM repräsentieren MW \pm SA von drei unabhängigen Experimenten, die mit HLM stammen aus einem Einzelversuch, spiegeln aber die in 3.1.1.1 erhaltenen Werte wider. G, Glucuronid.

Die Glucuronidierung an Position 4' des Daidzeins nahm mit HLM um 48% ab (von 148 pmol/(Min x mg Protein) auf 77 pmol/(Min x mg Protein)). Mit RNM wurde die Glucuronidierung an Position 4', aufgrund der geringen Mengen an gebildetem Daidzein-4'-Glucuronid, bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Da die eingesetzten Konzentrationen von Daidzein und E2 bei Verwendung von RNM mit 20 μM etwas über $K_{0,5}$ (16 μM), bei HLM mit 25 μM jedoch unter $K_{0,5}$ (29 μM) lagen (s. Tabelle 3.2), wurden niedrigere Konzentrationen von Daidzein und E2 mit RNM glucuronidiert (2,5 μM , 5 μM und 10 μM). Allerdings konnte auch bei niedrigeren Konzentrationen keine signifikante Steigerung der E2-3-Glucuronidierung durch Daidzein erreicht werden. Lediglich der Einsatz von 10 μM E2 und 10 μM Daidzein führte zu einer leichten Erhöhung der E2-3-Glucuronidierung (von 20,5 pmol/(Min x mg Protein) auf 23,5 pmol/(Min x mg Protein)). Bisher wurden die Konzentrationen von E2 und Daidzein immer gleich hoch gewählt. Die Kombination unterschiedlicher Konzentrationen von E2 (5 μM) und Daidzein (10 oder 20 μM) resultierte jedoch auch nicht in der gewünschten Steigerung der E2-3-Glucuronidierung.

Ein Problem bei den niedrigeren E2- bzw. Daidzeinkonzentrationen war, dass die

mittels HPLC-Analyse und UV-Detektion erhaltenen Peakflächen der Glucuronide sehr gering waren. Dies machte vor allem den Nachweis des E2-3-G, dessen Extinktionskoeffizient (verglichen mit E2 oder E2-17-G) nur halb so groß ist, sehr schwierig. Aufgrund dieser Detektionsprobleme war die Bestimmung der Hill-Kinetik nicht leicht, da diese sich hauptsächlich bei sehr geringen Substratkonzentrationen von der Michaelis-Menten-Kinetik unterscheidet. Außerdem könnte die beschriebene Detektionsproblematik dazu geführt haben, dass der Nachweis einer Steigerung der E2-3-Glucuronidierung durch Daidzein mit RNM nicht möglich war. Es wäre jedoch auch denkbar, dass für die heterotrope Aktivierung der E2-3-Glucuronidierung die Bildung des Daidzein-4'-Glucuronids von Bedeutung ist. Dieses wurde in RNM nur in nicht quantifizierbaren Mengen nachgewiesen.

Zusammenfassend gab es hinsichtlich der E2-Glucuronidierung zwischen der humanen Leber und der Rattenniere zwar Übereinstimmungen (Metabolitenspektrum, Kinetik sowie kinetische Parameter), der Nachweis einer heterotropen Aktivierung der E2-3-Glucuronidierung durch Daidzein scheint jedoch mit RNM nicht möglich zu sein. Somit stellte die Rattenniere kein geeignetes biologisches Modell für die weitere Untersuchung der E2-Glucuronidierung in intakten Zellen dar.

3.1.3. Untersuchungen mit Zelllysät von kultivierten humanen Zelllinien

Kultivierte humane Zelllinien repräsentieren ein weiteres Testsystem zur Untersuchung der E2-Glucuronidierung bzw. für den Nachweis einer homotropen oder heterotropen Aktivierung der E2-3-Glucuronidierung in intakten Zellen. Es wurden humane Brustkrebszellen (MCF-7) bzw. humane Leberkrebszellen (HepG2) verwendet. Diese beiden Zelllinien wurden ausgewählt, um zum einen den Metabolismus von E2 in der Leber und zum anderen in einem Zielgewebe der E2-Wirkung zu verstehen.

Zunächst wurde die Glucuronidierungsfähigkeit von MCF-7- bzw. HepG2-Zelllysät untersucht. Durch Zugabe des Cosubstrates UDPGA zum Zelllysät findet, im Gegensatz zu Zellen in Kultur, nur die Glucuronidierung statt. Das Zelllysät wurde wie in 6.2.6.4 beschrieben hergestellt. Um den Proteingehalt/ 1×10^6 Zellen im jeweils verwendeten Zelllysät zu ermitteln, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (Beschreibung s. 6.2.3) durchgeführt. Dabei wurde der Gesamtproteingehalt verschiedener Zellpassagen bestimmt. Der Gesamtproteingehalt des Zelllysates ist jedoch nicht identisch mit dem Proteingehalt von Mikrosomen, da keine Zellfraktionierung stattgefunden hat. Außerdem wurde sowohl Zelllysät aus Zellen eingesetzt, die mit Nährmedium in Kultur

gehalten wurden, als auch Zelllysate aus Zellen, welche mit Dimethylsulfoxid (DMSO), als Lösungsmittelkontrolle, bzw. mit Substanzen wie z.B. Daidzein oder Genistein inkubiert wurden, um diese möglichen Einflüsse auf den Proteingehalt mit zu erfassen. Der Proteingehalt betrug in Zelllysate von MCF-7-Zellen $0,22 \text{ mg} \pm 0,04 \text{ mg}/1 \times 10^6$ Zellen und in HepG2-Zelllysate $0,20 \text{ mg} \pm 0,08 \text{ mg}/1 \times 10^6$ Zellen. Dies zeigt, dass verschiedene Substanzinkubationen und Zellpassagen den Gesamtproteingehalt in Zelllysate beider Zelllinien nur wenig beeinflussten und es auch kaum Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zelllysaten gab.

3.1.3.1. Ergebnisse mit MCF-7-Zelllysate

Zur Untersuchung der Glucuronidierung von E2 ($100 \mu\text{M}$) mit UDPGA als Cosubstrat wurde MCF-7-Zelllysate (25 bzw. 50×10^6 MCF-7-Zellen/ml) zwischen 40 und 60 Min inkubiert. Es konnten jedoch keine Glucuronide durch die HPLC-Analyse mit UV-Detektion nachgewiesen werden.

Da vermutet wurde, dass in den verwendeten MCF-7-Zellen die UGT-Aktivität zur Umsetzung von E2 zu gering ist, wurde versucht, durch Inkubation der MCF-7-Zellen mit Chrysin (Abbildung 3.8) vor der Herstellung des Zelllysates, die Expression der UGTs in den Zellen zu induzieren. Dadurch sollten größere Mengen an aktiven UGTs erhalten und in Folge dessen mehr Glucuronide erzeugt werden. Das Flavon Chrysin induziert hierbei vor allem UGT1A1 [Galijatovic et al. (2001); Walle et al. (2000)], das Isoenzym, welches spezifisch die Bildung des E2-3-G katalysiert [Gall et al. (1999); Senafi et al. (1994)].

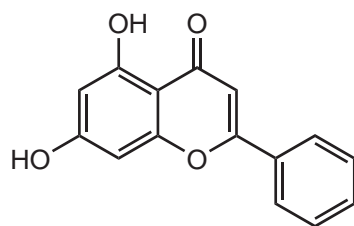


Abbildung 3.8.: Strukturformel von Chrysin (5,7-Dihydroxyflavon).

Für die Chrysininkubation wurden 3×10^6 MCF-7-Zellen ausgestreut. Die eingesetzte Chrysinkonzentration im Medium betrug $10 \mu\text{M}$, höhere Konzentrationen waren für die MCF-7-Zellen optisch cytotoxisch. Der Lösungsmittelanteil (DMSO) lag bei $0,1\%$. Parallel zur Chrysininkubation wurden Zellen nur mit DMSO inkubiert, um die Effekte des Chrysin beurteilen zu können. Die Inkubationszeiten betrugen 48 bzw.

72 h, wobei immer nach 24 h erneut eine Substanzgabe erfolgte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde wie in 6.2.6.4 erläutert Zelllysate dieser Zellen hergestellt. Die UGT-Induktion durch Chrysin konnte durch Glucuronidierungen mit dem Modellsubstrat TFMU (100 μ M) bestätigt werden (5 - 15 x 10⁶ MCF-7-Zellen/ml, Inkubationszeit 30 Min) und waren bei 72 h am größten. Da Chrysin, wie beschrieben, hauptsächlich ein Induktor der UGT1A1-Isoform darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass überwiegend die Induktion dieses Enzyms zur Steigerung der TFMU-Glucuronidierung führte. TFMU (Abbildung 3.9) stellt ein Cumarinderivat dar, das an Position 7 eine Hydroxylgruppe besitzt. Wie aus der Struktur erkennbar ist, kann TFMU nur ein Glucuronid bilden, es stellt aber für verschiedene UGTs (z.B. für UGT1A1, 1A3, 1A9 oder 2B7) ein sehr gutes Substrat dar. In der Regel können sehr hohe Umsatzraten erreicht werden, weshalb es oft als Modellsubstrat bei Glucuronidierungen verwendet wird [Baranczewski et al. (2004)].

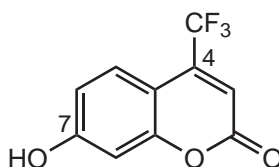


Abbildung 3.9.: Strukturformel von TFMU.

Um nun die E2-3-Glucuronidierung zu untersuchen, wurden MCF-7-Zellen mit 10 μ M Chrysin für 72 h inkubiert, da unter diesen Bedingungen die höchste Induktion der UGTs in MCF-7-Zellen stattgefunden hatte. Nach 72 h wurde aus diesen Zellen Zelllysate hergestellt und dieses für die Umsetzung von E2 (100 μ M) verwendet. Die Inkubationszeit betrug 2 h und die eingesetzte Zellzahl zwischen 15 x 10⁶ und 45 x 10⁶ Zellen/ml. Es wurde unter diesen Bedingungen E2-3-G gebildet, das durch Chromatographie mit einem E2-3-G-Standard identifiziert wurde. Jedoch war der Gehalt für eine Quantifizierung mittels HPLC-Analyse und UV-Detektor viel zu gering.

3.1.3.2. Ergebnisse mit HepG2-Zelllysate

Zur Untersuchung der HepG2-Zellen hinsichtlich ihrer Glucuronidierungsfähigkeit wurden 6 x 10⁶ Zellen ausgestreut und für 72 h mit Chrysin (10 μ M) inkubiert. Eine anschließende Glucuronidierung von TFMU (100 μ M) für 1 h mit HepG2-Zelllysate (50 x 10⁶ Zellen/ml) zeigte, dass auch in diesen Zellen die Induktion der UGTs durch Chrysin messbar war. Bei der Glucuronidierung von E2 (25 μ M) mit Lysat aus HepG2-

Zellen (50×10^6 Zellen/ml) betrug die Inkubationszeit 90 Min. Es konnten jedoch unter diesen Bedingungen keine Glucuronide mittels HPLC und UV-Detektor nachgewiesen werden. Mit Hilfe eines Standards wurde allerdings festgestellt, dass HepG2-Zellen, im Gegensatz zu MCF-7-Zellen, in der Lage sind, E2 an Position 17 zu oxidieren, was bedeutet, dass sie aktive HSDs besitzen. Die Oxidation von E2 zu E1 kann auch durch CYPs katalysiert werden [Zhu und Conney (1998a)], jedoch ist in kultivierten HepG2-Zellen die CYP-Aktivität gering [Lekas et al. (2000); Rodriguez-Antona et al. (2002)], so dass man davon ausgehen kann, dass in HepG2-Zellen die HSDs aktiv sind. Durch die Oxidation des E2 entstand E1 in beträchtlichen Mengen. Nach der Inkubationszeit von 90 Min lagen $88 \pm 10\%$ des E2 als E1 vor. Tabelle 3.6 zeigt, dass bei Glucuronidierungen mit HLM CL_{int} bzw. v_{max} von E1 kleiner waren als von E2, d.h. es wurden in der gleichen Zeit weniger E1-Glucuronide als E2-Glucuronide gebildet. Diese geringen Mengen können mittels UV-Detektion nicht mehr erfasst werden. Das Gleiche gilt für den kleinen Anteil an E2-Glucuroniden, der wahrscheinlich noch neben den E1-Glucuroniden entstand. Die starke Umwandlung von E2 in E1 stellt somit eine Ursache dafür dar, dass bei Glucuronidierungen von E2 mit HepG2-Zelllysat keine E2-Glucuronide detektiert werden konnten.

Zusammenfassend zeigte sich, dass durch Inkubationen der beiden Zelllinien (MCF-7, HepG2) mit Chrysin höhere UGT-Aktivitäten erhalten werden konnten. In MCF-7-Zelllysat war die UGT-Aktivität jedoch zu gering, um quantifizierbare Mengen an E2-3-G nachzuweisen. In HepG2-Zelllysat hingegen war die HSD-Aktivität eine Ursache dafür, dass keine E2-Glucuronide detektiert werden konnten. Die beiden untersuchten humanen Zelllinien (MCF-7- und HepG2-Zellen) stellten deshalb auch kein geeignetes biologisches Modellsystem dar, um die E2-Glucuronidierung in intakten Zellen zu untersuchen. Als drittes Testsystem wurden Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters (V79), welche mit dem humanen UGT1A1-Isoenzym stabil transfiziert sind (zur Verfügung gestellt von B. Burchell, School of Medicine, University of Dundee, Schottland), zur Untersuchung der E2-Glucuronidierung in Betracht gezogen. Jedoch gelang es nicht, geeignete Kulturbedingungen für diese Zellen zu finden.

3.2. Phase II-Metabolismus von CEs in verschiedenen biologischen Systemen

Die CEs (Abbildung 3.10) entstehen aus E2 bzw. E1 durch Hydroxylierungen an den Positionen 2 oder 4 des Steroidgerüsts (s. 1.1.1.1). Da diese sehr reaktive Produkte darstellen, die über die Oxidation zu den entsprechenden Semichinonen bzw. Chinonen und anschließendem Redoxcycling ROS bilden können (beschrieben in 1.1.2), wurde ihre Inaktivierung durch Phase II-Enzyme (COMT, UGTs) in dieser Arbeit untersucht.

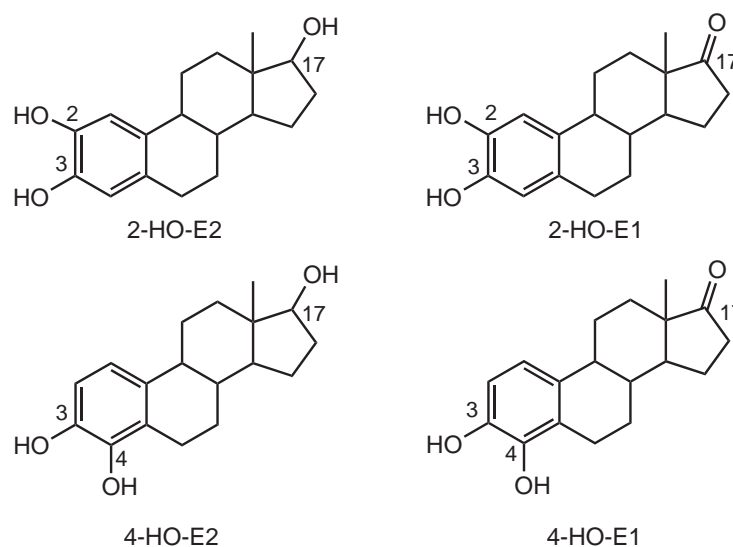


Abbildung 3.10.: Strukturformeln der vier CEs.

3.2.1. Die Methylierung der CEs

Ein wichtiger Inaktivierungsweg für die CEs stellt die Methylierung durch die COMT mittels SAM als Cosubstrat dar (s. 1.1.1.3). Diese wurde mit humanem Lebercytosol (HLC) bzw. in kultivierten humanen Zelllinien (MCF-7 und HepG2) untersucht. Außerdem wurde die CE-Methylierung mit V79-Zelllysatsat ermittelt. Diese Zelllinie zeigt keinen oxidativen Metabolismus [Doehmer (2003)], über die COMT-Aktivität ist jedoch nichts bekannt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Kinetik, welche der Methylierung zugrunde liegt, mit HLC und MCF-7-Zelllysatsat.

3.2.1.1. Methylierung der CEs mit HLC

Um die Kinetik zu untersuchen, nach welcher die Methylierung der CEs mit HLC abläuft, wurde zuerst der lineare Bereich des Enzyms bestimmt. Dazu wurde exemplarisch ein CE, das 2-HO-E2, mit HLC in Anwesenheit des Cosubstrates SAM methyliert (Durchführung s. 6.2.4.2). Das 2-HO-E2 wurde ausgewählt, da es als gutes Substrat der COMT beschrieben wurde [Roy et al. (1990); Zhu und Liehr (1996)]. Als Konzentration wurde die bei der Bestimmung der Kinetik höchste einzusetzende Konzentration ($100\text{ }\mu\text{M}$) verwendet. Die Inkubationszeiten lagen zwischen 10 und 70 Min, die Proteinmenge betrug 1 mg/ml . Die gebildeten Methylierungsprodukte wurden in der HPLC mittels UV-Detektion analysiert. Bei der Methylierung von 2-HO-E2 konnten zwei Methylierungsprodukte detektiert werden. Eines wurde durch Cochromatographie mit einem Standard als 2-MeO-E2 identifiziert. Daraufhin wurde der zweite Peak dem 2-HO-3-O-Methyl (Me)-E2 zugeordnet. Die Flächen der beiden Methylierungsprodukte wurden addiert, um den Gesamtumsatz zu ermitteln und daraus die jeweilige katalytische Aktivität/mg Protein zu berechnen. Diese wurden gegen die Inkubationszeiten aufgetragen (Abbildung 3.11). Es zeigte sich, dass die COMT aus HLC über die gesamte untersuchte Zeitspanne linear arbeitete.

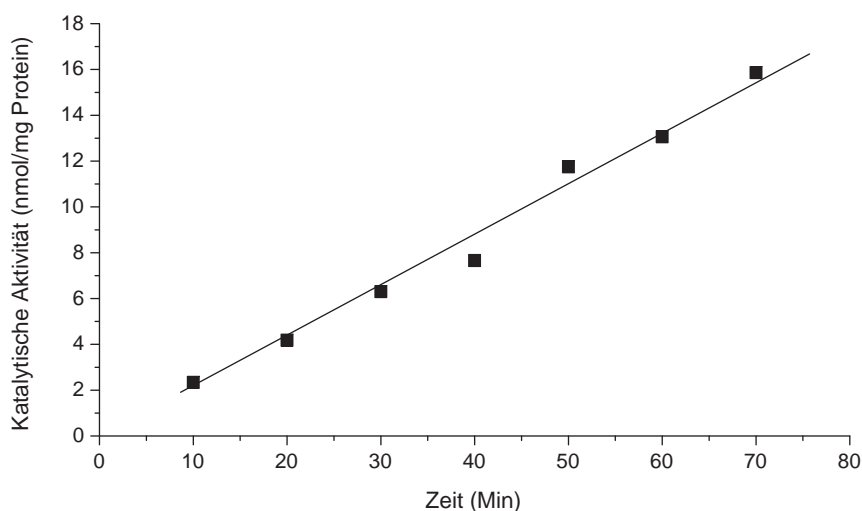


Abbildung 3.11.: Linearer Bereich der COMT bei der Methylierung von 2-HO-E2 ($100\text{ }\mu\text{M}$) mit HLC und SAM als Cosubstrat. Die Linearität wurde bei einem Proteingehalt von 1 mg/ml und Inkubationszeiten von 10 - 70 Min bestimmt. Die abgebildeten Werte stammen aus einer Einfachbestimmung.

Aufgrund der Ergebnisse in Abbildung 3.11 wurden die Inkubationszeiten bei der Bestimmung der kinetischen Profile zwischen 10 und 60 Min gewählt. Die eingesetzten CE-Konzentrationen lagen zwischen 5 und 100 μM und der Proteingehalt bei 1 mg/ml. Die Methylierung wurde nach 6.2.4.2 durchgeführt. Wie bei 2-HO-E2 konnten bei der Verwendung von 2-HO-E1 als Substrat zwei Methylierungsprodukte nachgewiesen werden. Auch hier wurde 2-MeO-E1 durch Cochromatographie mit einem Standard identifiziert und daraufhin 2-HO-3-O-Me-E1 dem zweiten Metabolitenpeak zugeordnet. Die Verhältnisse zwischen den jeweiligen Flächen der zwei Metaboliten von 2-HO-E2 und 2-HO-E1 betrugen 2,7 (2-MeO-E2/2-HO-3-O-Me-E2) bzw. 1,6 (2-MeO-E1/2-HO-3-O-Me-E1), d.h. dass die Methylierung von 2-HO-E2 und 2-HO-E1 an Position 2 überwogen hat. Bei den anderen beiden verwendeten CEs, 4-HO-E2 und 4-HO-E1, wurde jeweils nur ein Methylierungsprodukt nachgewiesen. Auch diese wurden mittels Standard als 4-MeO-E2 bzw. 4-MeO-E1 identifiziert. Die katalytischen Aktivitäten der Methylierungsreaktionen wurden berechnet und gegen die jeweils eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen. Daraus wurde die zugrunde liegende Kinetik nach 6.2.4.5 bestimmt. In Tabelle 3.3 sind das erhaltene kinetische Profil sowie die jeweiligen errechneten kinetischen Kenngrößen der CEs dargestellt. Der Methylierung der vier CEs durch die COMT des HLC lag immer eine Hemmkinetik zugrunde.

Tabelle 3.3.: Kinetische Parameter der Methylierung der vier CEs mit HLC und SAM als Cosubstrat. Bei der Bildung von zwei Methylierungsprodukten sind sowohl die Werte für den Gesamtumsatz als auch die Daten für die Methylierung an den verschiedenen Hydroxylgruppen (C2, C3) angegeben. H, Hemmkinetik; v_{\max} , maximale Geschwindigkeit; K_m , Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit; K_s , Hemmkonstante; CL_{int} , intrinsische Clearance; P., Protein.

Substrat	Kinetik	v_{\max} (pmol/(Min x mg P.))	K_m (μM)	K_s (μM)	CL_{int} ($\mu\text{l}/(\text{Min} \times \text{mg P.})$)
2-HO-E2	H	1350	14	26	96
C2	H	1090	14	24	78
C3	H	585	15	16	39
2-HO-E1	H	1080	8	74	135
C2	H	800	8	66	100
C3	H	620	8	51	78
4-HO-E2	H	590	20	9	30
4-HO-E1	H	330	6	70	55

Bei Methylierungen durch die COMT in einem *in vitro* System wird davon ausgegangen, dass in der Regel eine Hemmkinetik als kinetisches Profil vorliegt. Dies wird hauptsächlich dem aus SAM gebildeten SAH zugeschrieben, das an die COMT bindet und dadurch mit dem CE um die Bindungsstelle konkurriert (kompetitive Hemmung). Nach seiner Bindung kann jedoch keine Methylierung stattfinden, da SAH die dafür notwendige Methylgruppe nicht zur Verfügung stellen kann, was einer nicht-kompetitiven Hemmung entspricht [Zhu (2002)]. In intakten Zellen wird das SAM aus SAH regeneriert, während sich bei Inkubationen mit Mikrosomen oder Zelllysaten das SAH ansammelt und zur Hemmung der COMT-katalysierten Methylierung führt. Bei der Methylierung durch die COMT hemmt somit nicht das Substrat selbst bzw. das Reaktionsprodukt die Reaktion, sondern das Produkt des Cosubstrates. Tabelle 3.3 zeigt außerdem, dass die 2-HO-CEs eine höhere CL_{int} (96 bzw. 135 $\mu\text{l}/(\text{Min} \times \text{mg Protein})$) bzw. v_{max} besaßen (1350 und 1080 $\text{pmol}/(\text{Min} \times \text{mg Protein})$) als die 4-HO-CEs. Die errechneten v_{max} können jedoch aufgrund der zugrunde liegenden Hemmkinetik *in vitro* bei hohen Konzentrationen nicht erreicht werden. Der niedrige K_m -Wert bei den E1-CEs bedeutet, dass die COMT eine höhere Affinität zu diesen beiden CEs hatte als zu den E2-CEs. Die Hemmkonstante (K_s) gibt Hinweise für das Ausmaß der Hemmung. Ist K_s klein (z.B. bei 4-HO-E2), ist die Hemmung stark. Umgekehrt drückt eine größere K_s , wie sie z.B. bei 2-HO-E1 auftrat, eine geringere Hemmung aus und damit eine Annäherung an die Michaelis-Menten-Kinetik.

3.2.1.2. Methylierung der CEs mit Zelllysaten kultivierter Zellen

Die Methylierung der CEs wurde mit Zelllysaten von V79-, MCF-7- und HepG2-Zellen untersucht. Durch Zugabe des Cosubstrates der COMT, SAM, läuft spezifisch nur diese Reaktion ab, so dass, verglichen zu kultivierten Zellen, ein einfacheres Testsystem vorliegt.

Ergebnisse mit Zelllysaten von V79-Zellen

Zur Untersuchung der CE-Methylierung mit V79-Zelllysaten (10×10^6 Zellen/ml) wurden CE-Konzentrationen von 2,5 - 10 μM verwendet. Die Inkubationszeit betrug 20 Min, die Aufarbeitung folgte 6.2.4.2. Die entstandenen Methylierungsprodukte wurden an der HPLC mittels UV-Detektor analysiert. Bei Umsetzungen mit 2-HO-E2 wurden erneut 2-MeO-E2 und 2-HO-3-O-Me-E2 detektiert, und aus 2-HO-E1 bildeten sich 2-MeO-E1 bzw. 2-HO-3-O-Me-E1. Jedoch waren die Verhältnisse zwischen

2-MeO-E2 und 2-HO-3-O-Me-E2 mit 8 ± 4 bzw. zwischen 2-MeO-E1 und 2-HO-3-O-Me-E1 mit 7 ± 2 sehr ähnlich und deutlich höher als mit HLC, wobei die große Standardabweichung zu beachten ist. Dies zeigt, dass mit V79-Zelllysate viel mehr 2-MeO-E2 bzw. 2-MeO-E1 gebildet wurde als 2-HO-3-O-Me-E2 und 2-HO-3-O-Me-E1. Für 4-HO-E2 bzw. 4-HO-E1 wurde nur jeweils ein Methylierungsprodukt nachgewiesen und mittels Standard als 4-MeO-E2 bzw. 4-MeO-E1 identifiziert. Somit konnten mit V79-Zelllysate alle Methylierungsprodukte der CE's nachgewiesen werden, die bereits in den Untersuchungen mit HLC auftraten (s. 3.2.1.1). In Abbildung 3.12 sind exemplarisch die Ergebnisse der Methylierung der vier CE's, eingesetzt in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$, dargestellt.

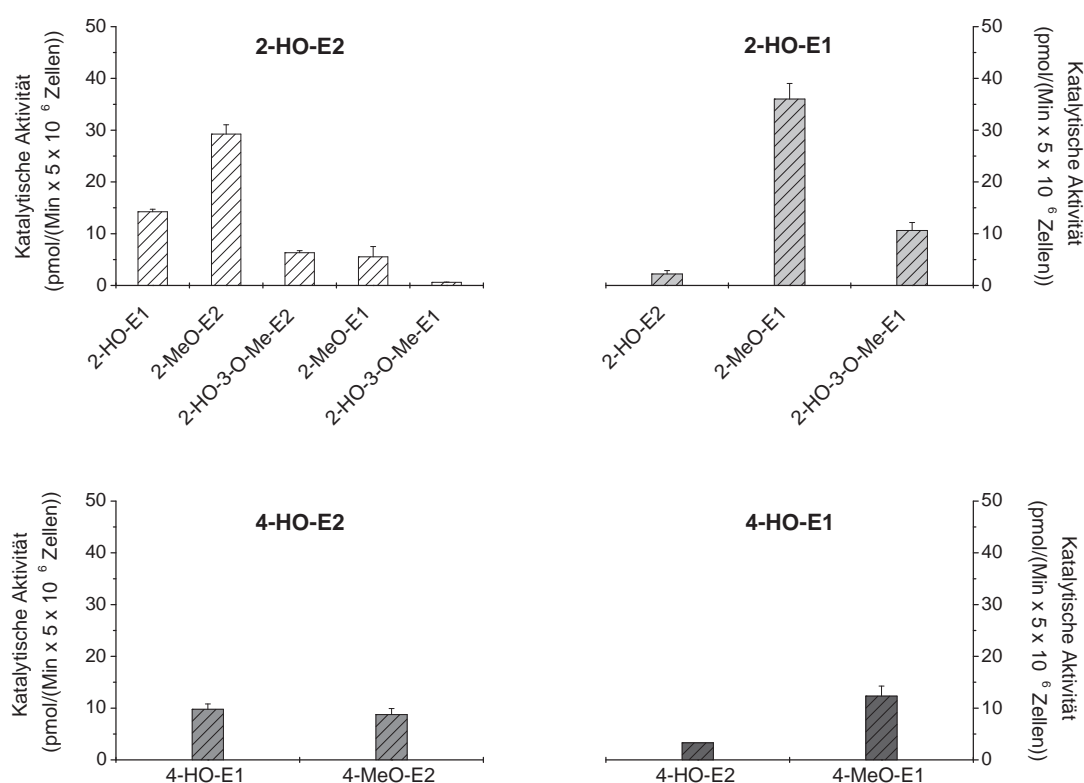


Abbildung 3.12.: Methylierung der CE's ($10 \mu\text{M}$) mit Zelllysate von V79-Zellen (10×10^6 Zellen/ml) und SAM als Cosubstrat. Die Inkubationszeit betrug 20 Min. Die katalytische Aktivität wurde in $\text{pmol}/(\text{Min} \times 5 \times 10^6 \text{ Zellen})$ angegeben, da 5×10^6 Zellen einem Gesamtproteingehalt von 1 mg entsprechen (s. 3.1.3). Die dargestellten Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SW}$ von zwei unabhängigen Experimenten.

Es wird deutlich, dass bei Inkubationen mit 2-HO-E2 und 2-HO-E1, wie bei HLC, höhere Aktivitäten erreicht wurden als mit 4-HO-E2 bzw. 4-HO-E1. Außerdem ist ersichtlich, dass beim Einsatz von 2-HO-E2 bzw. 4-HO-E2 zusätzlich ihre entsprechenden E1-CEs gebildet wurden und bei 2-HO-E1 sowie 4-HO-E1 die E2-CEs. Dies spricht dafür, dass, wie auch bei HepG2-Zelllysate (s. 3.1.3.2), die HSDs aktiv waren, welche die gegenseitige Umwandlung zwischen 17 β -Hydroxysteroiden und 17-Ketosteroiden katalysieren (s. 1.1.1.2). Dabei fand überwiegend die Oxidation der E2-CEs statt, die Reduktion der E1-CEs war nicht so stark ausgeprägt. Die Methylierungsprodukte dieser CEs, die während der Inkubationen durch aktive HSDs gebildet wurden, konnten nicht detektiert werden. Lediglich bei der Umsetzung mit 2-HO-E2 wurden die Methylierungsprodukt des 2-HO-E1, das 2-MeO-E1 sowie das 2-HO-3-O-Me-E1, nachgewiesen (s. Abbildung 3.12).

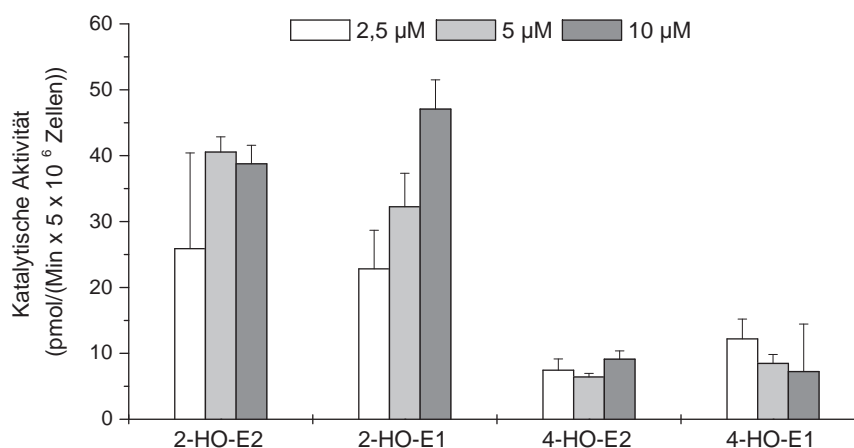


Abbildung 3.13.: Methylierung der CEs (2,5 - 10 µM) mit Zelllysate von V79-Zellen (10×10^6 Zellen/ml). Die Inkubationszeit betrug 20 Min. Die katalytische Aktivität wurde in pmol/(Min \times 5×10^6 Zellen) angegeben, da 5×10^6 Zellen einem Gesamtproteingehalt von 1 mg entsprechen (s. 3.1.3). Die abgebildeten Werte repräsentieren MW \pm SW von zwei unabhängigen Experimenten.

Die erhaltenen katalytischen Aktivitäten aller eingesetzten CE-Konzentrationen sind in Abbildung 3.13 gezeigt. Dabei entsprechen die für 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 dargestellten katalytischen Aktivitäten der Summe der Aktivitäten beider Methylierungsprodukte. Die Umwandlung der E2-CEs in die entsprechenden E1-CEs wurde nicht berücksichtigt. Nur bei 2-HO-E1 konnte über den eingesetzten Konzentrationsbereich

eine Zunahme der Aktivität erhalten werden. Setzt man dagegen 2-HO-E2 um, scheint die COMT bereits ab einer Konzentration von 5 μM mit Substrat gesättigt zu sein. Bei den an Position 4 hydroxylierten CEs war ebenfalls keine Erhöhung mit der verwendeten Konzentration sichtbar. Wurden die Umwandlungsprodukte in die Auswertung einbezogen, änderte sich an diesem Ergebnis nichts (s. Anhang A.2).

Ergebnisse mit Zelllysate von MCF-7-Zellen

Mit Zelllysate von MCF-7-Zellen (5×10^6 MCF-7-Zellen/ml) wurde zuerst die Kinetik, welche der Methylierung durch die COMT in diesem Testsystem zugrunde liegt, bestimmt. Dazu wurden CE-Konzentrationen zwischen 2,5 und 100 μM eingesetzt. Die Inkubationszeiten betrugen je nach Substrat und Konzentration zwischen 15 und 90 Min (Durchführung s. 6.2.4.2).

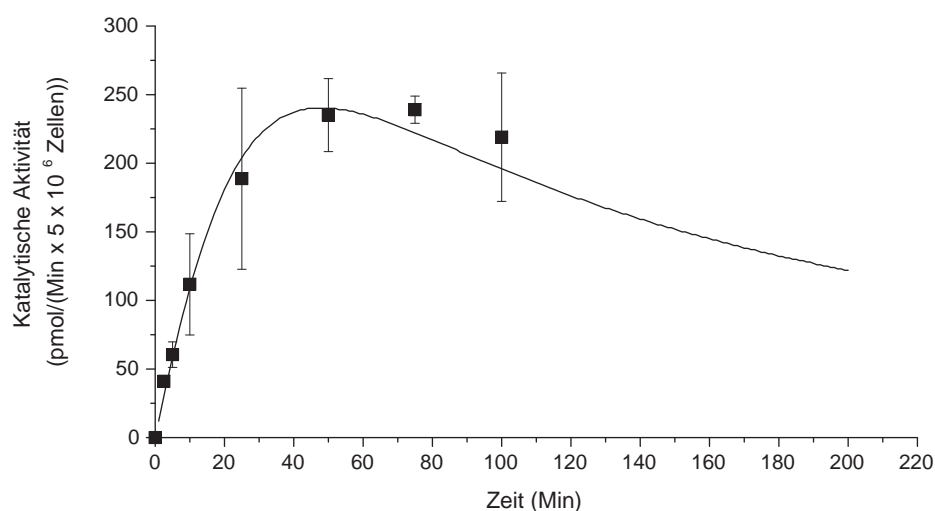


Abbildung 3.14.: Hemmkinetik der Methylierung von CEs am Beispiel von 2-HO-E2 (5 - 100 μM) mit MCF-7-Zelllysate aus 5×10^6 Zellen/ml sowie SAM. Die Inkubationszeiten betrugen zwischen 15 und 90 Min. Es wurde die Summe der katalytischen Aktivitäten der beiden Methylierungsprodukte 2-MeO-E2 und 2-HO-3-O-Me-E2 dargestellt. Die abgebildeten Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SA}$ von 3 unabhängigen Experimenten.

Auch mit Zelllysate von MCF-7-Zellen konnten die gleichen Methylierungsprodukte nachgewiesen werden wie mit V79-Zelllysate und HLC. Die aus den Umsetzungen erhaltenen katalytischen Aktivitäten wurden gegen die eingesetzte CE-Konzentration

aufgetragen. Dabei wurden bei 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 die Summen der katalytischen Aktivitäten ihrer beiden Methylierungsprodukte (2-MeO-E2 und 2-HO-3-O-Me-E2 sowie 2-MeO-E1 und 2-HO-3-O-Me-E1) verwendet. Dies ist in Abbildung 3.14 am Beispiel von 2-HO-E2 gezeigt. Wie bei den Untersuchungen mit HLC folgte die Kurvenanpassung sowohl bei 2-HO-E2 als auch bei den anderen drei untersuchten CEs einer Hemmkinetik. Aus diesen Darstellungen wurden die kinetischen Parameter, wie in 6.2.4.5 beschrieben, für jedes CE ermittelt. Diese sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Wiederum wird deutlich, dass auch mit Zelllysate aus MCF-7-Zellen bei der Methylierung von 2-HO-E2 und 2-HO-E1 eine größere v_{\max} (1243 bzw. 1300 pmol/(Min \times 5×10^6 Zellen)) bzw. eine höhere CL_{int} nachgewiesen wurde als bei 4-HO-E2 bzw. 4-HO-E1. Da es sich um eine Hemmkinetik handelt, wird v_{\max} , ebenso wie mit HLC, bei hohen Konzentrationen nicht erreicht. Die höhere Affinität zum Enzym besaßen jedoch 4-HO-E2 und 4-HO-E1. Eine starke Hemmung wurde, gemäß K_s , bei 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 nachgewiesen. Durch die höhere katalytische Aktivität bei der Umsetzung mit diesen beiden CEs entsteht mehr SAH, welches dann die COMT stärker hemmt.

Tabelle 3.4.: Kinetische Parameter der Methylierung der vier CEs mit MCF-7-Zelllysate (5×10^6 Zellen/ml). Bei der Bildung von zwei Methylierungsprodukten sind die Werte für den Gesamtumsatz angegeben. H, Hemmkinetik; v_{\max} , maximale Geschwindigkeit; K_m , Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit; K_s , Hemmkonstante; CL_{int} , intrinsische Clearance; P., Protein.

Substrat	Kinetik	v_{\max} (pmol/(Min \times mg P.))	K_m (μM)	K_s (μM)	CL_{int} ($\mu\text{l}/(\text{Min} \times \text{mg P.})$)
2-HO-E2	H	1243	100	23	12, 4
2-HO-E1	H	1300	131	33	9, 9
4-HO-E2	H	115	20	75	5, 8
4-HO-E1	H	240	47	75	5, 1

Bildet man, analog zu dem V79-Zelllysate (Abbildung 3.13), die katalytischen Aktivitäten der CE-Methylierung mit MCF-7-Zelllysate (5×10^6 Zellen/ml) im Konzentrationsbereich von 2,5 - 10 μM ab (Abbildung 3.15), ist auf der linken Seite zu sehen, dass bei drei CEs (2-HO-E2, 2-HO-E1, 4-HO-E1) eine Zunahme der katalytischen Aktivität mit der Konzentration nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch bei 4-HO-E2. Auf der rechten Seite dieser Abbildung sind die Ergebnisse der Umsetzung mit

5 μM der CE's noch einmal genauer dargestellt. Die Verhältnisse zwischen den beiden Methylierungsprodukten von 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 ähnelten mit $2,4 \pm 0,1$ bzw. $1,7 \pm 1,1$ wieder mehr dem Ergebnis mit HLC. Auch mit MCF-7-Zelllysate stellten somit 2-MeO-E2 bzw. 2-MeO-E1 die Hauptmetaboliten dar.

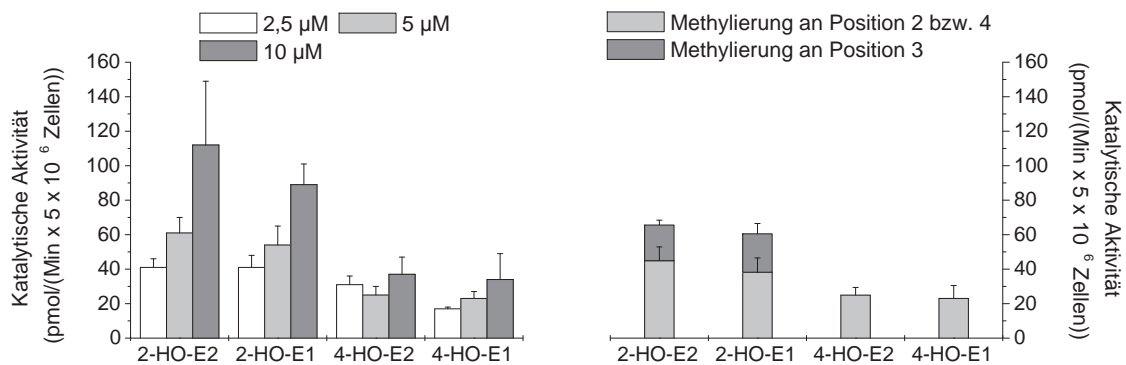


Abbildung 3.15.: Gesamtaktivitäten der Methylierung von CE's (2,5 - 5 μM) mit MCF-7-Zelllysate (5 x 10⁶ Zellen/ml), (links). Die Inkubationszeiten betrugen 15 - 40 Min. Auf der rechten Seite ist die Methylierung des jeweiligen CE (5 μM) genauer dargestellt. Es sind die Verhältnisse 2-MeO-E2/2-HO-3-O-Me-E2 sowie 2-MeO-E1/2-HO-3-O-Me-E1 abgebildet. Die Summe der Einzelaktivitäten bei 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 ergeben die links abgebildeten Gesamtaktivitäten. Die Werte repräsentieren MW \pm SA von drei unabhängigen Experimenten.

Eine Umwandlung der CE's durch HSDs wurde mit MCF-7-Zelllysate nicht nachgewiesen. Verglichen mit den erhaltenen katalytischen Aktivitäten des V79-Zelllysates, methyliert das MCF-7-Zelllysate besser. Ein Vergleich ist jedoch schwierig, da offensichtlich mit V79-Zelllysate die Umsetzungen nicht immer im linearen Bereich der COMT durchgeführt wurden bzw. mit MCF-7-Zelllysate auch keine Umwandlung der E2-CE's in ihre entsprechenden E1-CE's und zurück stattfand.

Ergebnisse mit Zelllysate von HepG2-Zellen

In Abbildung 3.16 sind die Ergebnisse der CE-Methylierung (2,5 - 10 μM) mit HepG2-Zelllysate (5 x 10⁶ Zellen/ml) dargestellt. Auch mit HepG2-Zelllysate wurden die gleichen Methylierungsprodukte nachgewiesen wie mit den bisher untersuchten Testsystemen. Außerdem wiesen die Methylierungen der 2-HO-CE's wieder höhere Aktivitäten auf als diejenigen der 4-HO-CE's. Von den 4-HO-CE's wurde 4-HO-E1 etwas besser methyliert als 4-HO-E2. Nur für 2-HO-E2 und teilweise für 2-HO-E1 konnte ein Anstieg

der Aktivität mit der Substratkonzentration nachgewiesen werden, nicht jedoch für 4-HO-E2 und 4-HO-E1. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei diesen beiden CEs unter den verwendeten Bedingungen bereits Substratsättigung vorlag. Auch bei einer Verdoppelung der Enzymmenge auf 10×10^6 Zellen/ml konnte keine Zunahme der katalytischen Aktivität mit den eingesetzten Substratkonzentrationen festgestellt werden. Diese Ergebnisse ähneln somit mehr den in Abbildung 3.13 gezeigten Resultaten mit V79-Zelllysate. Insgesamt konnten mit HepG2-Zelllysate, verglichen mit dem Lysate der anderen beiden Zelllinien, die höchsten COMT-Aktivitäten erhalten werden.

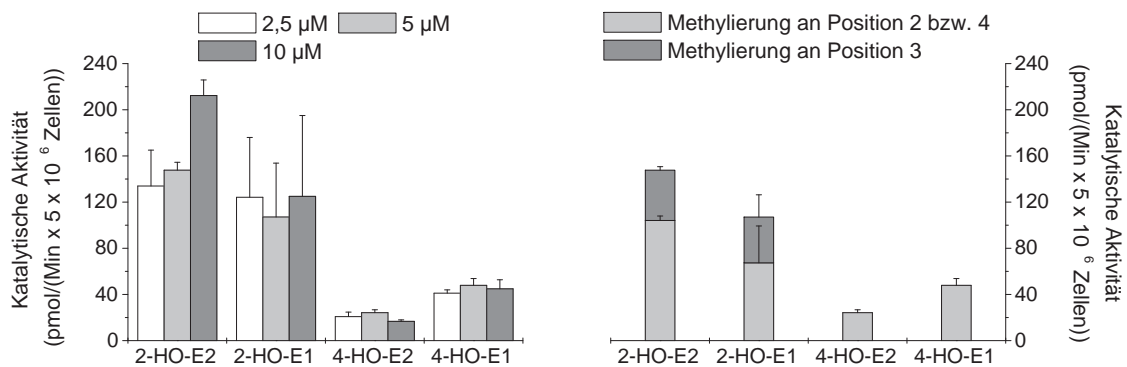


Abbildung 3.16.: Gesamtaktivitäten der Methylierung von CEs (2,5 - 10 µM) mit HepG2-Zelllysate (5×10^6 Zellen/ml), (links). Die Inkubationszeiten betrugen 15 - 40 Min. Auf der rechten Seite ist die Methylierung des jeweiligen CE (5 µM) genauer dargestellt. Es sind die Verhältnisse 2-MeO-E2/2-HO-3-O-Me-E2 bzw. 2-MeO-E1/2-HO-3-O-Me-E1 abgebildet sowie die erhaltenen Gesamtaktivitäten aller vier CEs. Die Werte repräsentieren $MW \pm SA$ von drei unabhängigen Experimenten.

Betrachtet man die Verhältnisse der jeweiligen Methylierungsprodukte von 2-HO-E2 und 2-HO-E1, die durch die Umsetzungen mit HepG2-Zelllysate erreicht wurden (Abbildung 3.16), sind diese mit den Verhältnissen des MCF-7-Zelllysates sowie mit denen des HLC vergleichbar (Tabelle 3.5). Dies zeigt, dass auch mit diesem Zelllysate mehr 2-MeO-E2 bzw. 2-MeO-E1 als 2-HO-3-O-Me-E2 und 2-HO-3-O-Me-E1 gebildet wurde. Starke Abweichungen von den Werten dieser drei Systeme wurden nur, wie in Tabelle 3.5 zu sehen ist, mit Zelllysate aus V79-Zellen erhalten, wobei mit diesem Zelllysate die Standardabweichungen viel größer waren, verglichen mit den anderen verwendeten Testsystemen. Die V79-Zellen haben, im Gegensatz zu den anderen ein-

gesetzten Zellen, keinen humanen Ursprung. Als Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters stammen sie von einer anderen Spezies, weshalb diese Abweichungen von den humanen Zelllinien durchaus in Speziesunterschieden begründet sein können.

Tabelle 3.5.: Vergleich der Verhältnisse 2-MeO-E2/2-HO-3-O-Me-E2 bzw. 2-MeO-E1/2-HO-3-O-Me-E1 in verschiedenen untersuchten biologischen Systemen.

Substrat	V79	MCF-7	HepG2	HLC
2-HO-E2	8 ± 4	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,7
2-HO-E1	7 ± 2	1,7 ± 1,1	1,8 ± 0,2	1,6

Wie bereits in 3.1.3.2 beschrieben, waren auch in HepG2-Zelllysate die HSDs aktiv. Jedoch fand hier, im Unterschied zum V79-Zelllysate, nur eine Umwandlung der E2-CEs in die E1-CEs statt. Der umgekehrte Weg, die Reduktion zu den E2-CEs, konnte nicht nachgewiesen werden. Abbildung 3.17 zeigt aber, dass die Umwandlung in der Gesamtaktivität keine große Rolle spielte, weshalb sie in Abbildung 3.16 nicht berücksichtigt wurde.

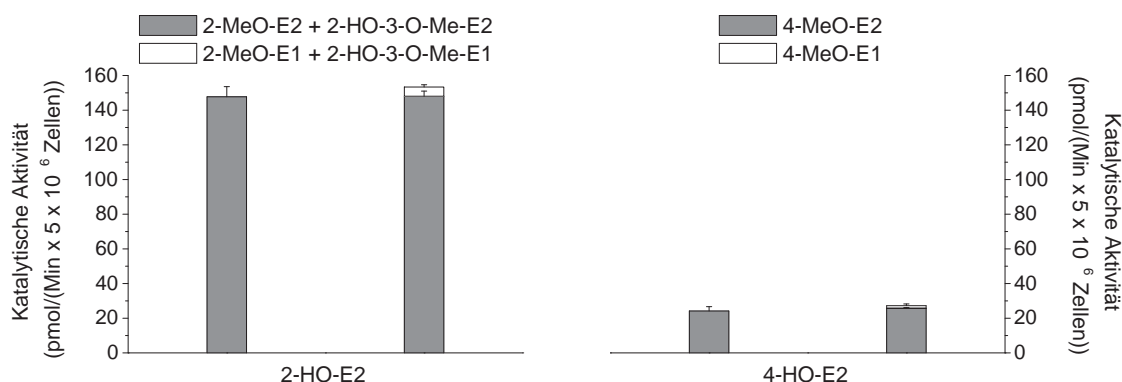


Abbildung 3.17.: Bildung der Methylierungsprodukte aus 5 μ M 2-HO-E2 (links) bzw. 4-HO-E2 (rechts) mit HepG2-Zelllysate (5 x 10⁶ Zellen/ml) und SAM als Cosubstrat, ohne (linker Balken) und mit Berücksichtigung der E1-Umwandlungsprodukte (rechter Balken). Die abgebildeten Werte repräsentieren MW \pm SA von zwei unabhängigen Experimenten.

3.2.1.3. Methylierung von CEs in kultivierten MCF-7- und HepG2-Zellen

In intakten Zellen sind verschiedene fremdstoffmetabolisierende Enzyme aktiv und auch ihre entsprechenden Cosubstrate sind vorhanden, weshalb in den Zellen eine komplexere Metabolisierungssituation gegeben ist als im Zelllysats. Neben der Methylierung jedes der vier CEs wurde die gegenseitige Beeinflussung der Methylierung bei Coinkubationen von jeweils zwei verschiedenen CEs untersucht. Zusätzlich wurde der zeitliche Verlauf der Methylierung der CEs in MCF-7- und HepG2-Zellen verfolgt sowie der Einfluss der Isoflavone Daidzein und Genistein bzw. des Flavonols Quercetin auf die COMT-Aktivität in den genannten Zelllinien analysiert. Aufgrund der Reaktivität der CEs (s. 1.1.2) wurde zuerst ihre Stabilität in Zellkulturmedium bestimmt.

Stabilität von CEs in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12

Zur Untersuchung der CE-Methylierung in kultivierten Zellen wurde die Stabilität der CEs in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F12 mit (10%) und ohne fetalem Kälberserum (FKS) bei Raumtemperatur bis zu 24 h untersucht. Die CE-Konzentration wurde bei diesen Inkubationsversuchen mit $2,5\text{ }\mu\text{M}$ gering gewählt, um sich den physiologischen Konzentrationen anzunähern. Deshalb wurde diese Konzentration für die Prüfung der Stabilität übernommen. Zum Vergleich wurde die Stabilität der CEs ($2,5\text{ }\mu\text{M}$) in Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) ermittelt. Außerdem wurde die Stabilität des Flavonols Quercetin ($2,5\text{ }\mu\text{M}$) miterfasst. Die Strukturformel von Quercetin ist in Abbildung 3.18 zu sehen. Quercetin stellt ebenfalls ein Catechol dar und wurde deshalb in verschiedenen Versuchen als Vergleichssubstanz mitgeführt.

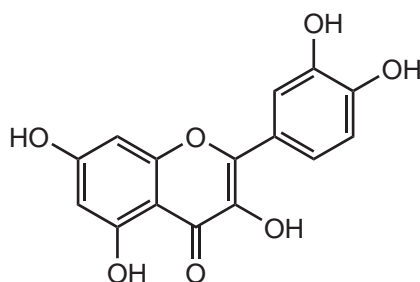


Abbildung 3.18.: Strukturformel von Quercetin.

Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte die Extraktion des jeweiligen CE mit Ethylacetat, das Entfernen des Ethylacetats unter Vakuum, die Aufnahme des Rückstandes in Methanol sowie die HPLC-Analyse mit UV-Detektion. Die Verluste bei der Extraktion mit Ethylacetat wurden durch Zugabe von 3,5,3',5'-Tetramethylbisphenol A (TMBPA) als interner Standard bestimmt und in der Auswertung berücksichtigt (Durchführung s. 6.2.9).

In Abbildung 3.19 sind die Ergebnisse der Stabilitätsprüfung in Medium mit bzw. ohne FKS sowie in Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) dargestellt. Es wird deutlich, dass die fünf Catechole in Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) am stabilsten waren.

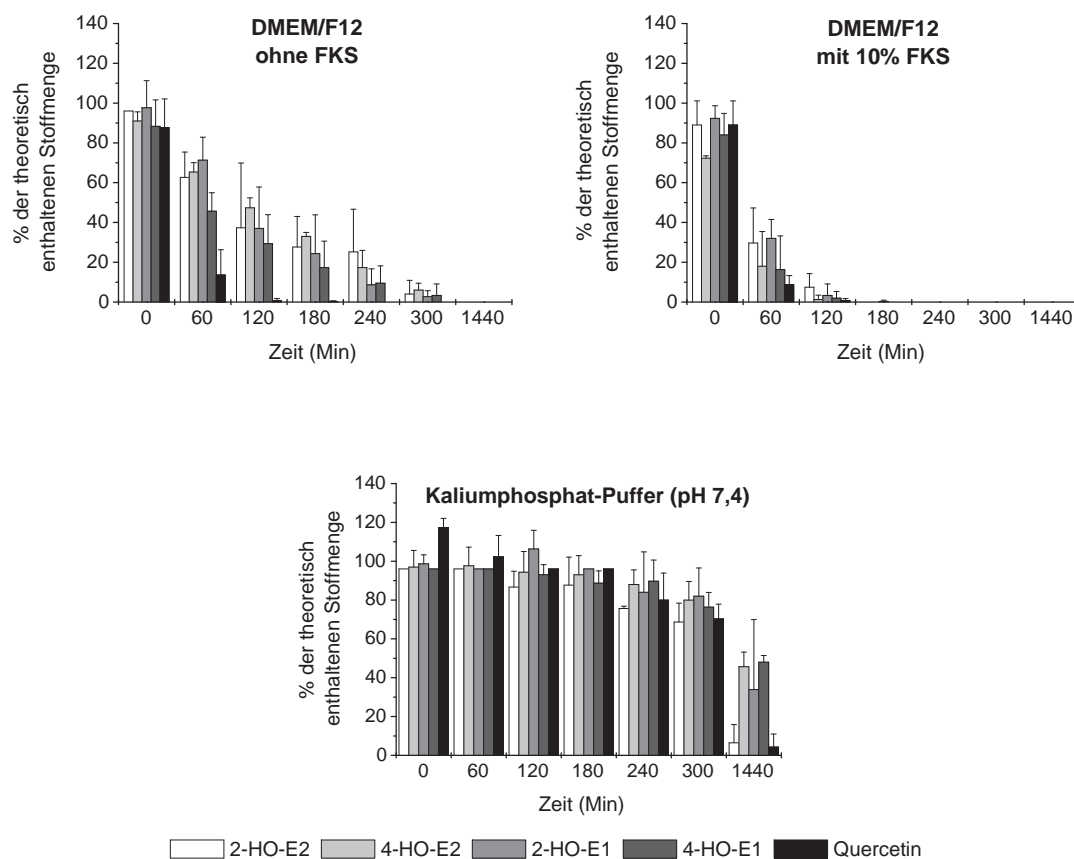


Abbildung 3.19.: Stabilität von Catecholen ($2,5 \mu\text{M}$) in DMEM/F12 mit (10%) bzw. ohne FKS sowie in Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) bei Raumtemperatur. Dargestellt sind $\text{MW} \pm \text{SA}$ von drei unabhängigen Experimenten.

In Puffer wurden bei allen Catecholen nach 5 h immer noch 80 - 90% der theoretisch enthaltenen Stoffmenge detektiert. Auch nach 24 h konnte noch Substanz mittels HPLC-Analyse und UV-Detektion nachgewiesen werden. Vergleicht man die Stabilität der Catechole in DMEM/F12 mit und ohne FKS-Zusatz, sank der Gehalt in Medium mit FKS schneller ab als in DMEM/F12 ohne FKS. Außerdem ist erkennbar, dass sich alle fünf Catechole in den drei Matrices nahezu gleich verhielten. Nur der Gehalt an Quercetin war in DMEM/F12 ohne FKS geringer als derjenige der vier CEs. Nach 3 h konnte kaum noch Quercetin in diesem Medium gefunden werden, während bei den CEs nach 5 h noch ca. 5% der theoretisch enthaltenen Stoffmenge detektiert werden konnten.

Ergebnisse in Medium von kultivierten MCF-7- und HepG2-Zellen

Zunächst wurde das Medium von mit CEs (2, 5 μ M) inkubierten MCF-7- bzw. HepG2-Zellen (2×10^6 Zellen pro Zellkulturschale) nach dessen Extraktion mit Ethylacetat auf gebildete Methylierungsprodukte in der HPLC mittels UV-Detektion untersucht. Die Inkubationszeit mit den CEs betrug 1 h bei MCF-7-Zellen bzw. 2 h bei HepG2-Zellen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.20 gezeigt. Es konnten dieselben Methylierungsprodukte in der HPLC mittels UV-Detektion nachgewiesen werden wie mit MCF-7- bzw. HepG2-Zelllysate (s. Abbildung 3.15 sowie 3.16).

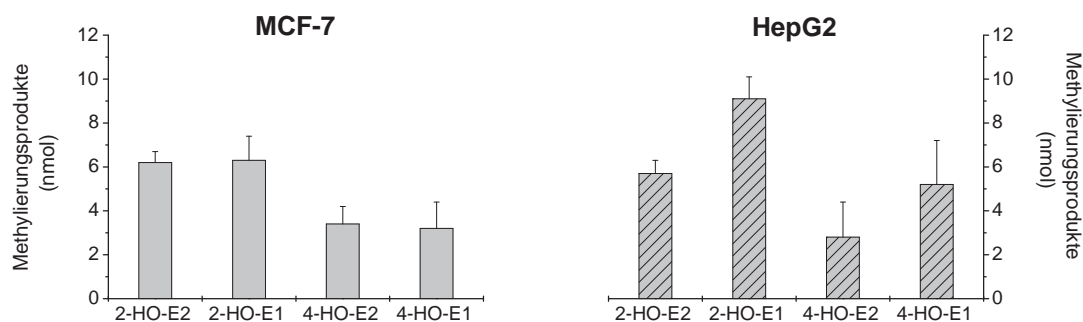


Abbildung 3.20.: Gebildete Menge an CE-Methylierungsprodukten in Medium von mit CEs inkubierten MCF-7- (links) bzw. HepG2-Zellen (rechts). Es wurden 2×10^6 Zellen pro Zellkulturschale ausgestreut. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei den MCF-7- und 2 h bei HepG2-Zellen. Bei 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 ist jeweils die Summe der beiden Methylierungsprodukte dargestellt. Die Werte repräsentieren $MW \pm SW$ von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Menge an Methylierungsprodukten setzte sich somit bei 2-HO-E2 und 2-HO-E1 aus den Stoffmengen der beiden gebildeten Methylierungsprodukte, 2-MeO-E2 und 2-HO-3-O-Me-E2 sowie 2-MeO-E1 bzw. 2-HO-3-O-Me-E1, zusammen. Bei den MCF-7-Zellen war die detektierte Menge an Methylierungsprodukten von 2-HO-E2 im Medium genauso groß wie von 2-HO-E1. Auch bezüglich der 4-HO-CEs war dies der Fall (Abbildung 3.20, links). Insgesamt wurden bei 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 mehr Methylierungsprodukte gebildet als bei 4-HO-E2 bzw. 4-HO-E1. Vergleicht man dagegen die im Medium inkubierter HepG2-Zellen erhaltenen Mengen an Methylierungsprodukten der E2-CEs mit denen der jeweiligen E1-CEs, wurden bei 2-HO-E2 sowie bei 4-HO-E2 weniger Produkte gebildet als beim Einsatz von 2-HO-E1 und 4-HO-E1 (Abbildung 3.20, rechts).

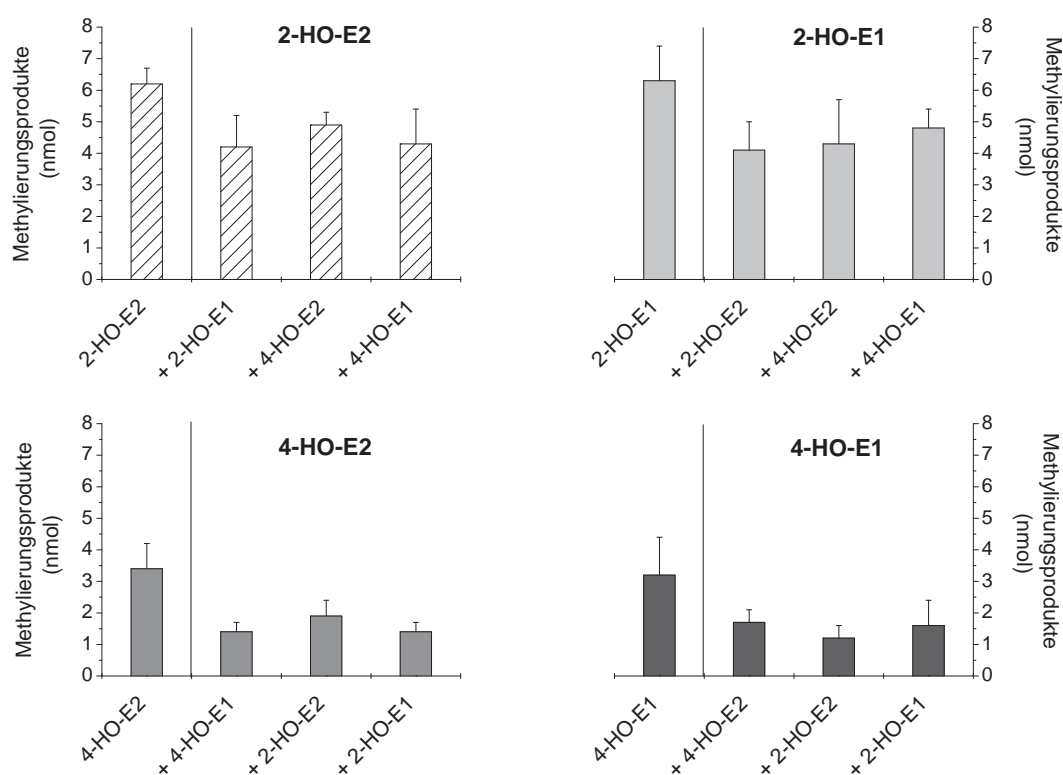


Abbildung 3.21.: Coinkubationen von 2×10^6 MCF-7-Zellen mit CEs ($2, 5 \mu\text{M}$). An erster Stelle stehen die im Inkubationsmedium der Zellen nachgewiesenen Mengen an Methylierungsprodukten des jeweiligen CE ohne Anwesenheit eines zweiten CE. Es folgen die Methylierungsprodukte des gleichen CE in Kombination mit einem der drei anderen CEs. Bei 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 ist die Summe der gebildeten Mengen beider Methylierungsprodukte dargestellt. Die Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SA}$ von drei unabhängigen Experimenten.

Eine Erklärung hierfür gibt die in HepG2-Zellen stattfindende Umwandlung der E2-CEs in ihre E1-CEs durch die HSDs, die in der Auswertung nicht berücksichtigt wurde. Sie konnte bereits mit Lysat der HepG2-Zellen detektiert werden (s. Abbildung 3.17). In Medium inkubierter MCF-7-Zellen wurde, wie mit MCF-7-Zelllysate (s. 3.2.1.2), keine Umwandlung der E2-CEs in die E1-CEs und umgekehrt detektiert.

Die Ergebnisse der Coinkubationen, die bei beiden Zelllinien mit jeweils zwei verschiedenen CEs (je 2,5 μ M) für 1 h (MCF-7-Zellen) bzw. 2 h (HepG2-Zellen) durchgeführt wurden, zeigen die Abbildungen 3.21 (MCF-7-Zellen) und 3.22 (HepG2-Zellen).

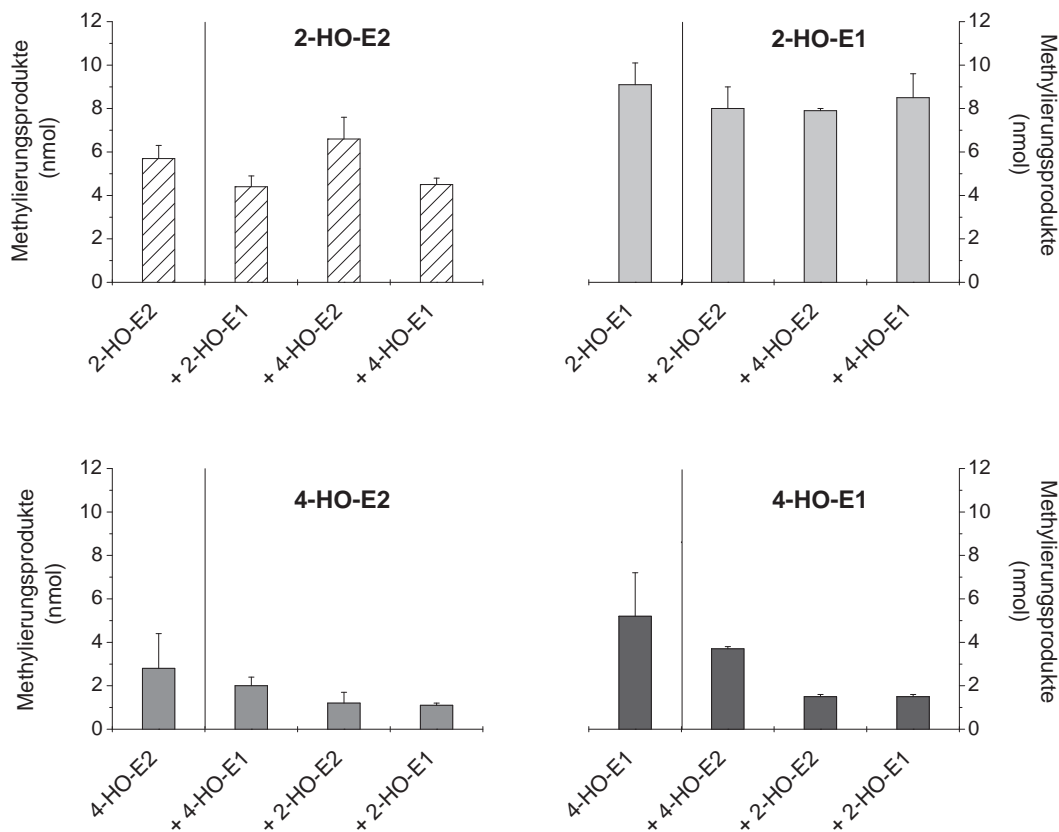


Abbildung 3.22.: Coinkubationen von 2×10^6 HepG2-Zellen mit CEs (2,5 μ M). An erster Stelle stehen die im Inkubationsmedium der Zellen nachgewiesenen Mengen an Methylierungsprodukten des eingesetzten CE ohne Anwesenheit eines zweiten CE. Es folgen die Methylierungsprodukte des gleichen CE in Kombination mit einem der drei anderen CEs. Bei 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 ist die Summe der gebildeten Mengen beider Methylierungsprodukte dargestellt. Die Werte repräsentieren $MW \pm SW$ von zwei unabhängigen Experimenten.

Es ist erkennbar, dass bei Verwendung von MCF-7-Zellen alle vier untersuchten CEs vermindert methyliert wurden, sobald ein zweites CE als Substrat für die COMT zur Verfügung stand. Der Anteil, um den die Produktbildung reduziert wurde, war unabhängig davon, welches andere CE im Medium vorhanden war (s. Abbildung 3.21). Deutlich wurde bei Untersuchungen des Mediums dieser Zellen auch, dass 4-HO-E2 und 4-HO-E1 stärker in ihrer Methylierung gehemmt wurden (zwischen 44 und 62%) als 2-HO-E2 oder 2-HO-E1 (zwischen 21 und 35%). Im Inkubationsmedium von HepG2-Zellen war, verglichen mit den MCF-7-Zellen, die Hemmung der CE-Methylierung in Anwesenheit eines zweiten CE schwächer ausgeprägt und nicht so einheitlich (Abbildung 3.22). Dennoch wurde auch hier deutlich, dass 4-HO-E2 und 4-HO-E1 stärker gehemmt wurden (zwischen 29 und 71%) als 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 (zwischen 7 und 23%). Bei der Methylierung von 2-HO-E2 konnte in Anwesenheit von 4-HO-E2 eine Steigerung um 16%, bei gleichzeitiger Hemmung der 4-HO-E2-Methylierung um 57%, gemessen werden. Die in HepG2-Zellen stattfindende Umwandlung der E2-CEs in E1-CEs wurde in Abbildung 3.22 nicht berücksichtigt.

Als nächstes wurde der zeitliche Verlauf der Bildung von Methylierungsprodukten aus CEs (2,5 μ M) im Medium von inkubierten MCF-7- und HepG2-Zellen (2×10^6) mittels Ethylacetat-Extraktion (Durchführung s. 6.2.6.5) über eine Zeitspanne von 7 h untersucht. Die Ergebnisse von MCF-7- und HepG2-Zellen wurden zum besseren Vergleich gegenüber gestellt. Sie sind für 2-HO-E1 bzw. 4-HO-E1 in Abbildung 3.23 sowie für 2-HO-E2 und 4-HO-E2 in Abbildung 3.24 gezeigt. Es ist ersichtlich, dass in allen Versuchen die eingesetzten CEs mit der Zeit abnahmen, wobei sie im Inkubationsmedium von HepG2-Zellen länger nachweisbar waren. Die Menge an Methylierungsprodukten hingegen stieg bis zum Erreichen eines Maximums, das zwischen 2 und 6 h lag, an. Beim Einsatz von 2-HO-E1 (Abbildung 3.23, oben) bzw. 2-HO-E2 (Abbildung 3.24, oben) sank der Gehalt im Medium von HepG2-Zellen nach dem erreichten Maximum deutlich schneller wieder ab als bei MCF-7-Zellen. Betrachtet man in Abbildung 3.23 unten die Methylierung von 4-HO-E1 fällt auf, dass es im Medium der HepG2-Zellen in den ersten beiden Stunden schnell abreagierte, trotzdem aber weniger Methylierungsprodukte als bei den MCF-7-Zellen entstanden. Das gebildete 4-MeO-E1 blieb im Inkubationsmedium beider Zelllinien relativ konstant vorhanden. Auch bei Inkubationen mit 4-HO-E2 (s. Abbildung 3.24, unten) war der Gehalt an Methylierungsprodukten im Medium beider Zelllinien nach Erreichen eines Maximums konstant und in etwa vergleichbar. Zusätzlich sieht man auch bei diesen Versuchen deutlich, dass die 2-HO-CEs effektiver methyliert wurden als die 4-HO-CEs.

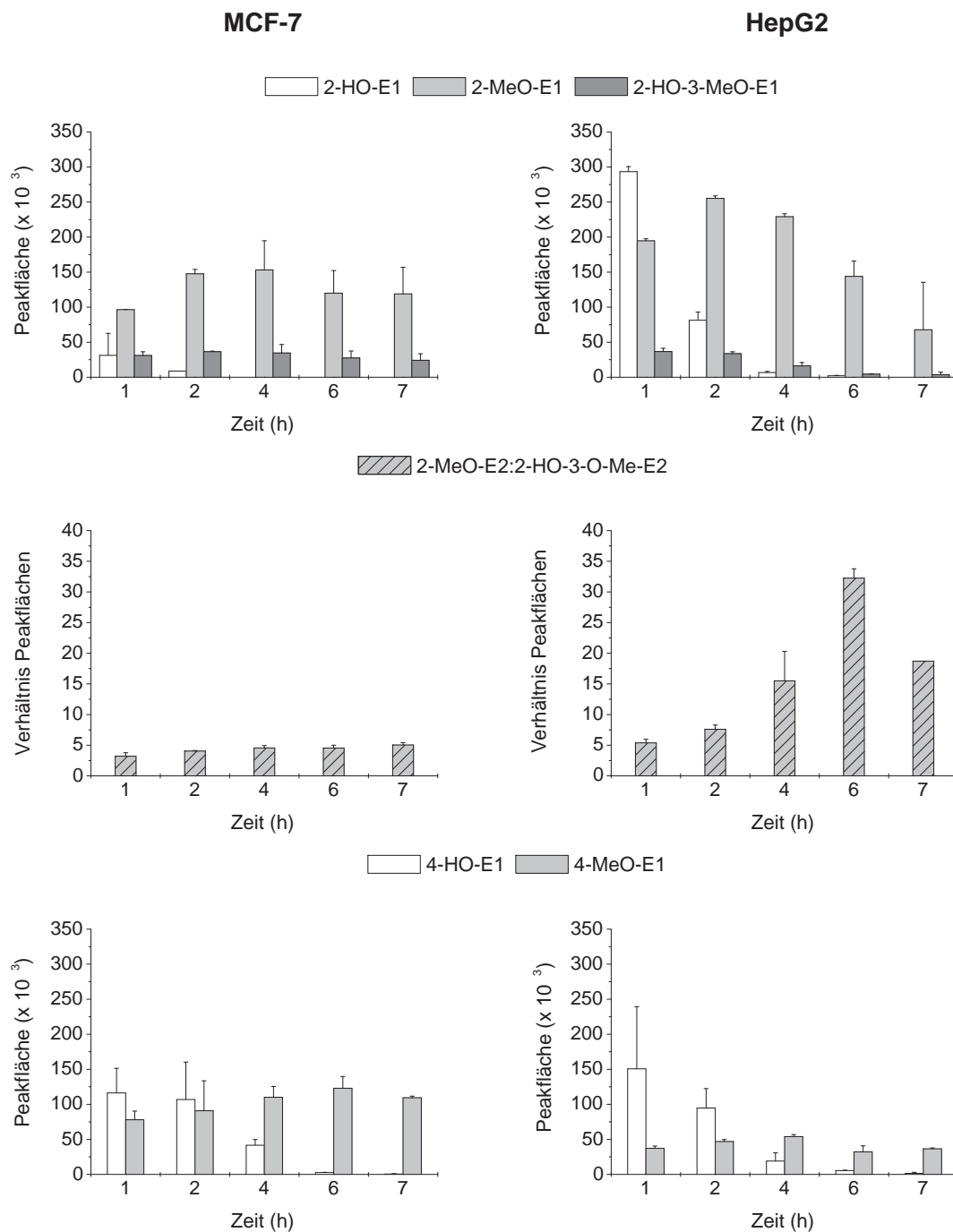


Abbildung 3.23.: Zeitlicher Verlauf der Methylierung von 2-HO-E1 (oben) und 4-HO-E1 (unten) bei MCF-7- (links) und HepG2-Zellen (rechts). Außerdem ist die zeitliche Änderung des Verhältnisses der beiden Methylierungsprodukte des 2-HO-E1 im Inkubationsmedium von MCF-7- und HepG2-Zellen dargestellt (Mitte). Die abgebildeten Werte repräsentieren $MW \pm SW$ von zwei unabhängigen Experimenten.

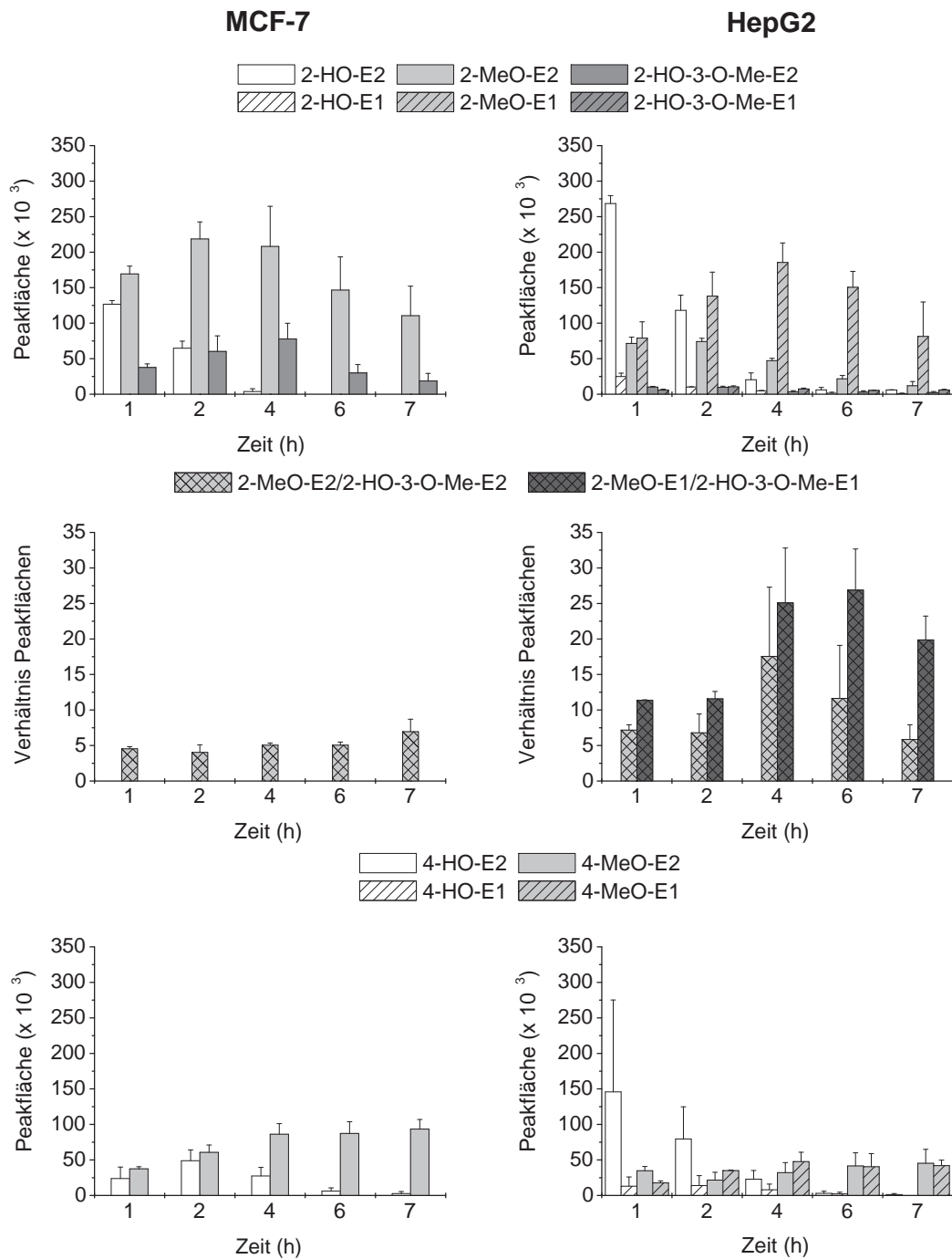


Abbildung 3.24.: Zeitlicher Verlauf der Methylierung von 2-HO-E2 (oben) und 4-HO-E2 (unten) bei MCF-7- (links) und HepG2-Zellen (rechts). Außerdem ist die zeitliche Änderung des Verhältnisses der beiden Methylierungsprodukte des 2-HO-E2 im Inkubationsmedium von MCF-7- und HepG2-Zellen dargestellt (Mitte). Die Werte repräsentieren MW \pm SW von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse von 2-HO-E2 bzw. 4-HO-E2 im Medium inkubierter HepG2-Zellen (Abbildung 3.24) zeichnen sich außerdem durch eine Vielzahl an Produkten aus, was in der bereits beschriebenen Umwandlung der E2-CEs in ihre entsprechenden E1-CEs durch die HSDs begründet ist. Auffällig ist vor allem bei Inkubationen mit 2-HO-E2, dass dem Methylierungsprodukt 2-MeO-E1, das aus der Umwandlung des 2-HO-E2 zu 2-HO-E1 und dessen anschließender Methylierung resultiert, größere Peakflächen zugeordnet werden konnten als 2-MeO-E2, dem Methylierungsprodukt von 2-HO-E2. Bei Inkubationen mit 4-HO-E2 war dies nicht so stark ausgeprägt.

In den Abbildungen 3.23 und 3.24 (Mitte) sind die Verhältnisse zwischen den beiden gebildeten Methylierungsprodukten von 2-HO-E2 (2-MeO-E2/2-HO-3-O-Me-E2) bzw. 2-HO-E1 (2-MeO-E1/2-HO-3-O-Me-E1) aufgezeigt. Während im Inkubationsmedium von MCF-7-Zellen die Verhältnisse innerhalb des untersuchten Zeitintervalls sehr konstant waren, stiegen diese bei den HepG2-Zellen stark an. Zwischen 4 und 6 h wurden Höchstwerte von 33 (2-HO-E1) bzw. 17 (2-HO-E2) erreicht, danach fielen die Verhältnisse wieder ab. Folglich nahmen im Inkubationsmedium von HepG2-Zellen die Gehalte von 2-MeO-E2 bzw. 2-MeO-E1 im Laufe der Zeit stärker zu als von 2-HO-3-O-Me-E2 bzw. 2-HO-3-O-Me-E1. Mit HLM stellten 2-HO-3-O-Me-E2 und 2-HO-3-O-Me-E1 bessere Substrate für die UGTs dar als 2-MeO-E2 bzw. 2-MeO-E1 [Pfeiffer, unveröffentlichte Daten]. Der Anstieg der Verhältnisse der Methylierungsprodukte im Medium inkubierter HepG2-Zellen könnte somit ein Hinweis dafür sein, dass zum einen Glucuronidierungsreaktionen in HepG2-Zellen stattfanden und zum anderen, dass dabei 2-HO-3-O-Me-E2 bzw. 2-HO-3-O-Me-E1 bevorzugt glucuronidiert wurden, was zur Zunahme der Verhältnisse führte. Im Vergleich dazu, scheint in MCF-7-Zellen die Glucuronidierung von 2-HO-3-O-Me-E2 und 2-HO-3-O-Me-E1 keine Rolle zu spielen.

Einfluss der Isoflavone Daidzein und Genistein auf die COMT-Aktivität in MCF-7- und HepG2-Zellen

Die Isoflavone Daidzein und Genistein besitzen keine Catecholstruktur (s. 1.10) und stellen deshalb selbst keine Substrate für die COMT dar. Sie treten somit nicht in direkte Konkurrenz mit den CEs um die Bindungsstelle der COMT. Da bekannt ist, dass Flavonoide, wie z.B. Chrysin, in die Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme eingreifen (s. 1.1.1.3), wurde mittels Langzeitinkubationen von MCF-7- und HepG2-Zellen mit Daidzein oder Genistein untersucht, ob die Isoflavone in der Lage sind, die COMT-Aktivität zu verändern und darüber Einfluss auf die Methylierung

der CEs zu haben. Die Versuche wurden exemplarisch mit 2-HO-E2 durchgeführt. Dazu wurden 1×10^6 MCF-7- bzw. HepG2-Zellen ausgestreut und für 48 bzw. 72 h mit den Isoflavonen (10 bzw. 20 μM) inkubiert. Außerdem wurden als Kontrolle parallel dazu Zellen nur mit dem Lösungsmittel der Isoflavone, DMSO, behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und danach eine einstündige Inkubation mit 2-HO-E2 (2, 5 μM) durchgeführt. Die gebildeten Methylierungsprodukte wurden nach Extraktion des abgenommenen Zellkulturmediums mit Ethylacetat, in Anwesenheit von TMBPA als interner Standard, mittels HPLC detektiert. Die Summe an Methylierungsprodukten von 2-HO-E2, die im Medium der mit DMSO behandelten Kontrollzellen nachgewiesen wurde, wurde 100% gesetzt. Daraufhin wurde die prozentuale Abweichung der Summe an Methylierungsprodukten in Medium von mit Isoflavonen inkubierten Zellen berechnet. Die genaue Durchführung zeigt 6.2.7.

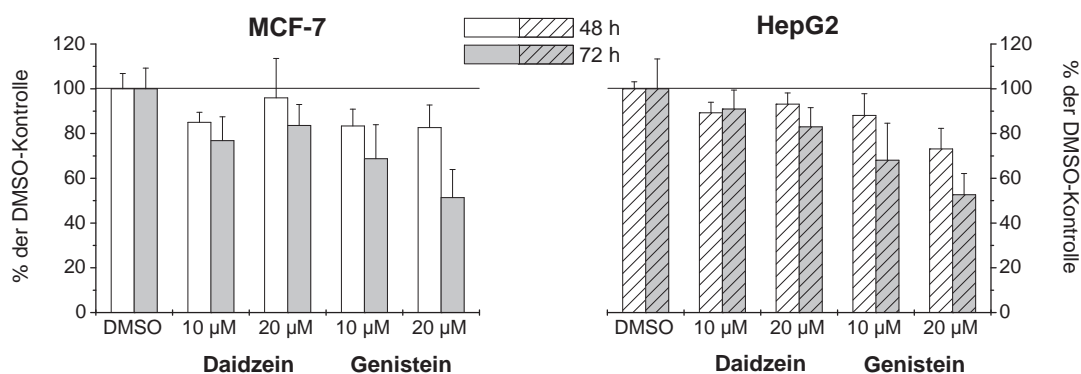


Abbildung 3.25.: Summe der Methylierungsprodukte von 2-HO-E2, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, im Inkubationsmedium von MCF-7- (links) und HepG2-Zellen (rechts) nach 48- bzw. 72-stündiger Inkubation mit Daidzein oder Genistein (10 bzw. 20 μM). Die nachfolgende Inkubation der Zellen mit 2-HO-E2 (2, 5 μM) dauerte 1 h. Die abgebildeten Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SA}$ von drei unabhängigen Experimenten.

Nach 48 h konnte nur im Inkubationsmedium von HepG2-Zellen bei 20 μM Genistein ein deutlicher Rückgang der Methylierung von 2-HO-E2 beobachtet werden, während bei MCF-7-Zellen unter den verwendeten Bedingungen kaum eine verminderte Methylierung nachgewiesen wurde (Abbildung 3.25). Bei einer Inkubationszeit von 72 h wurde im Medium beider Zelllinien eine konzentrationsabhängige Abnahme der Methylierung durch Genistein erhalten. Auch bei Daidzein war eine leichte Verminderung der Methylierung von 2-HO-E2 sichtbar (Abbildung 3.25). Allerdings muss darauf hin-

gewiesen werden, dass die Zellzahl bei den mit Isoflavonen inkubierten Zellen geringer war als bei den Kontrollzellen. Eine einmalige Berücksichtigung der Zellzahl bei der Auswertung zeigte, dass die Hemmung dennoch vorhanden war, jedoch kleiner ausfiel als in Abbildung 3.25 dargestellt (s. Anhang A.4).

Einfluss des Flavonols Quercetin auf die COMT-Aktivität in MCF-7-Zellen

Wie in Abbildung 3.18 zu sehen ist, besitzt das Flavonol Quercetin Catecholstruktur und ist deshalb ein Substrat für die COMT. Es wird wesentlich schneller als die endogenen Catechole von der COMT methyliert und ist außerdem ein starker exogener Inhibitor dieses Enzyms (s. 1.1.1.3). In diesen Versuchen wurden die MCF-7-Zellen, analog zu den soeben beschriebenen Experimenten mit den Isoflavonen Daidzein und Genistein, für 72 h mit Quercetin inkubiert. Der Versuchsaufbau ist in 6.2.7 beschrieben. Danach folgte eine Inkubation mit 2-HO-E2 ($2,5 \mu\text{M}$) ohne Anwesenheit von Quercetin.

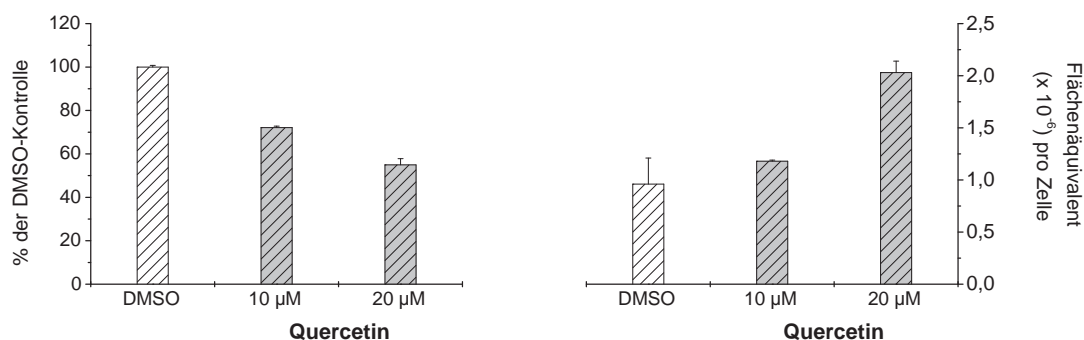


Abbildung 3.26.: Summe der Methylierungsprodukte von 2-HO-E2 in Medium von MCF-7-Zellen nach Inkubation (72 h) mit Quercetin (10 bzw. $20 \mu\text{M}$). Die nachfolgende Inkubation der Zellen mit 2-HO-E2 ($2,5 \mu\text{M}$) dauerte 1 h. Links sind die Methylierungsprodukte bezogen auf die DMSO-Kontrolle dargestellt, rechts bezogen auf die Zellzahl. Die Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SW}$ von zwei unabhängigen Experimenten.

Auch bei diesen Experimenten könnte man zunächst einen Rückgang der Methylierung mit steigender Konzentration in Bezug auf die DMSO-Kontrolle vermuten (Abbildung 3.26, links). Die Zellzahl war jedoch, wie bei den Isoflavonen, im Vergleich zur Kontrolle niedriger, wenn die MCF-7-Zellen mit Quercetin inkubiert wurden. Bezieht man die Zellzahl in die Auswertung ein (Abbildung 3.26, rechts), steigt die Methylierung konzentrationsabhängig an.

Zusammenfassend lässt sich über die Methylierung der CEs sagen, dass die mit *in vitro* Systemen erwartete Hemmkinetik der Methylierung mit dem untersuchten HLC bzw. dem MCF-7-Zelllysate bestätigt werden konnte. Die untersuchten Zelllinien (V79, MCF-7 und HepG2) unterschieden sich sowohl in der gemessenen COMT-Aktivität als auch in der HSD-Aktivität. Gemeinsam war allen getesteten Systemen, dass mit 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 höhere katalytische Aktivitäten bzw. Produktmengen erhalten wurden als mit den 4-HO-CEs. Das Isoflavon Genistein verminderte sowohl in MCF-7- als auch in HepG2-Zellen die COMT-Aktivität. Bei Daidzein konnte nur in HepG2-Zellen eine leichte Verminderung der COMT-Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, steigerte das Flavonol Quercetin in MCF-7-Zellen die Aktivität der COMT.

3.2.2. Die Glucuronidierung der CEs in verschiedenen biologischen Systemen

Die Glucuronidierung der CEs mit UDPGA stellt eine weitere Konjugationsreaktion dar, die in dieser Arbeit untersucht wurde. Durch die Bildung polarer Metaboliten führt die Glucuronidierung, im Gegensatz zur Methylierung, nicht nur zur Inaktivierung der reaktiven CEs, sondern auch zur Ausschleusung aus der Zelle und ist deshalb für die CEs ein sehr wichtiger Inaktivierungsmechanismus (s. 1.1.1.3). Die CE-Glucuronidierung wurde zuerst mit HLM untersucht. Als zweites Testsystem wurden HepG2-Zellen analysiert, da bereits in 3.1.3 darauf hingewiesen wurde, dass die MCF-7-Zellen in Kultur nur eine geringe UGT-Aktivität besaßen.

3.2.2.1. Ergebnisse mit HLM

Mit HLM wurden die der CE-Glucuronidierung zugrunde liegenden Kinetiken im linearen Bereich der UGTs bestimmt. Neben den CEs wurden zum Vergleich auch die kinetischen Parameter der Glucuronidierung anderer Estrogene (E1, Methylierungsprodukte der CEs) erfasst. Die Durchführung ist in 6.2.4.1 aufgezeigt.

Für 2-HO-E2, 4-HO-E2 sowie 2-MeO-E2 wurde bereits in 3.1.1.2 beschrieben, dass jeweils ein Glucuronid detektiert wurde. Bei allen anderen hier eingesetzten oxidativen Metaboliten des E2 wurde ebenfalls ein Glucuronid gebildet. Die genaue Position der Glucuronsäure konnte auch hier bei Metaboliten mit mehr als einer Hydroxylgruppe nicht bestimmt werden, da keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen. Bei Inkubationen mit dem Methylierungsprodukt von 4-HO-E1, 4-MeO-E1, konnten unter den gewählten Bedingungen (0,5 mg Protein/ml, Substratkonzentration: 25 µM, In-

kubationszeit: 30 Min) keine detektierbaren Mengen an Glucuroniden erzeugt werden, so dass für die Glucuronidierung dieses Metaboliten das zugrunde liegende kinetische Profil nicht untersucht wurde. Bei Experimenten von Lepine et al. (2004) mit humanen, rekombinanten UGTs wurde 4-MeO-E1 fast ausschließlich durch UGT1A8 glucuronidiert. Dieses Enzym kommt nur im Gastrointestinaltrakt und nicht in der Leber vor [Tukey und Strassburg (2001); Uchaipichat et al. (2004)], weshalb mit HLM keine Glucuronide von 4-MeO-E1 detektiert werden konnten. Auch bei der Glucuronidierung von E3 mit HLM wurden keine Glucuronide nachgewiesen. Mit RLM konnte bei Umsetzungen mit einem sehr hohen Proteingehalt (7 mg Protein/ml) und einer E3-Konzentration von 100 μM (Inkubationszeit: 60 Min) ein Glucuronid anhand einer Spaltung des Produkts mittels β -Glucuronidase nach 6.2.5 identifiziert werden, jedoch in sehr geringen Mengen. Alle Experimente mit E3 weisen folglich darauf hin, dass E3 kein gutes Substrat für die UGTs darstellt, weshalb auch die Untersuchung der Kinetik der E3-Glucuronidierung mit HLM entfiel.

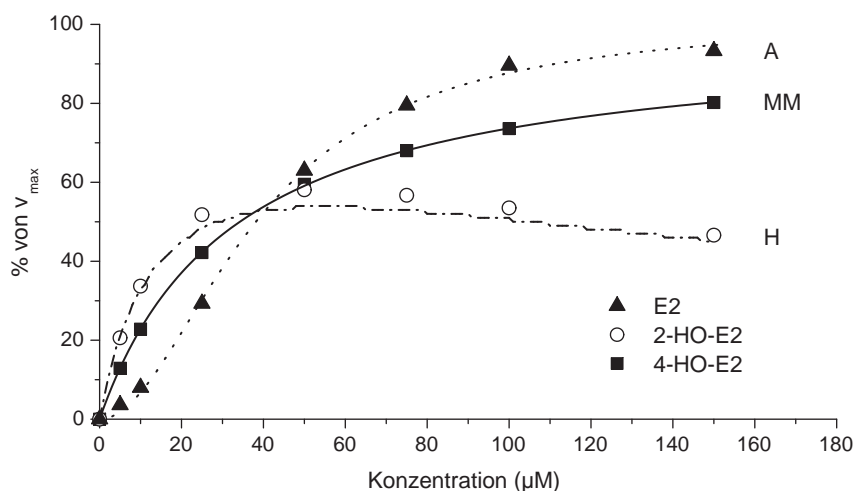


Abbildung 3.27.: Kinetiken der Glucuronidierung von E2 (an Position 3) und seinen Metaboliten. A, Aktivierungskinetik (Hill-Kinetik); MM, Michaelis-Menten-Kinetik; H, Hemmkinetik.

Um die kinetischen Daten zu erhalten, wurden die Substratkonzentrationen zwischen 5 und 150 μM variiert (0, 25 - 0, 5 mg Protein/ml, Inkubationszeiten 10 - 30 Min) und die katalytischen Aktivitäten der Glucuronidierung nach 6.2.4.1 bzw. 6.2.5 ermittelt. Die errechneten Geschwindigkeiten wurden gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen, um das kinetische Modell anpassen zu können (s. 6.2.4.5). In Abbildung 3.27 sind exemplarisch die drei verschiedenen kinetischen Modelle am Beispiel der

Glucuronidierung der CEs 2-HO-E2 und 4-HO-E2 sowie von E2 dargestellt. Tabelle 3.6 gibt einen Überblick aller erhaltenen Kinetiken sowie der errechneten kinetischen Daten für die CEs und die anderen eingesetzten Estrogene. Zum Vergleich wurden noch einmal die kinetischen Kenngrößen der E2-Glucuronidierung aufgezeigt (s. auch 3.1.1).

Tabelle 3.6.: Kinetische Parameter der Glucuronidierung von E2 und seinen Metaboliten mit HLM. A, Aktivierungskinetik (Hill-Kinetik); MM, Michaelis-Menten-Kinetik; H, Hemmkinetik; v_{\max} , maximale Geschwindigkeit; K_m ($K_{0,5}$), Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit; n , Hill-Koeffizient; K_s , Hemmkonstante; CL_{int} , intrinsische Clearance; P., Protein.

Substrat	Kinetik	v_{\max} (pmol/(Min x mg P.))	$K_m/K_{0,5}$ (μM)	n	K_s (μM)	CL_{int} ($\mu\text{l}/(\text{Min} \times \text{mg P.})$)
2-HO-E2	H	5150	20	1	150	258 \pm 13,0
2-HO-E1	H	3400	17	1	95	263 \pm 93,5
4-HO-E2	MM	4400	35	1	–	125 \pm 6,0
4-HO-E1	MM	23500	29	1	–	882 \pm 314,2
2-MeO-E2	MM	6400	195	1	–	33 \pm 2,6
2-MeO-E1	MM	1300	76	1	–	17 \pm 1,8
4-MeO-E2	H	1150	70	1	29	16 \pm 4,0
E1	H	170	18	1	120	8 \pm 1,0
E2 (3-G)	A	1100	29	1,7	–	20 \pm 4,7
E2 (17-G)	MM	180	11	1	–	17 \pm 3,5

Der Glucuronidierung der CEs und der anderen untersuchten E2-Metaboliten lag entweder eine Michaelis-Menten-Kinetik bzw. Hemmkinetik zugrunde. Folglich konnte mit HLM nur für die Bildung des E2-3-G eine Hill-Kinetik nachgewiesen werden (s. 3.1.1). Dies bedeutet, dass nur E2 in der Lage ist spezifisch seine Glucuronidierung an Position 3 zu aktivieren. Alle vier CEs wurden mit HLM deutlich besser glucuronidiert als das E2. Verglichen zum E2 war ihre jeweilige CL_{int} zwischen 6 und 44-mal größer, obwohl die Affinität der UGTs nicht höher war. Am effizientesten wurde 4-HO-E1 glucuronidiert. Die CL_{int} der Methylierungsprodukte der CEs lag in der gleichen Größenordnung wie die des E2. E1, das durch Oxidation des E2 an Position 17 entsteht (s. 1.1.1.2), besaß von allen eingesetzten Substanzen die geringste CL_{int} , obwohl dessen K_m und somit die Affinität der UGTs zu E1 höher war als bei den anderen oxidativen Metaboliten, mit Ausnahme von 2-HO-E1.

3.2.2.2. Ergebnisse mit HepG2-Zelllysats

Wie in Tabelle 3.6 gezeigt, wurden die CEs mit HLM sehr gut glucuronidiert, weshalb ihre Glucuronidierung zusätzlich in intakten Zellen untersucht werden sollte. Zunächst wurde dafür die Glucuronidierung der CEs mit HepG2-Zelllysats (50×10^6 Zellen/ml) unter Zugabe des Cosubstrates UDPGA nach 6.2.4.1 analysiert. Die eingesetzte CE-Konzentration wurde mit $50 \mu\text{M}$ sehr hoch gewählt, um detektierbare Peakflächen zu erhalten. Die Inkubationszeit betrug 1 h. Nach der Inkubation folgte eine saure Extraktion der gebildeten Glucuronide mit Ethylacetat, dessen Entfernung unter Vakuum und die HPLC-Analyse mit UV-Detektion.

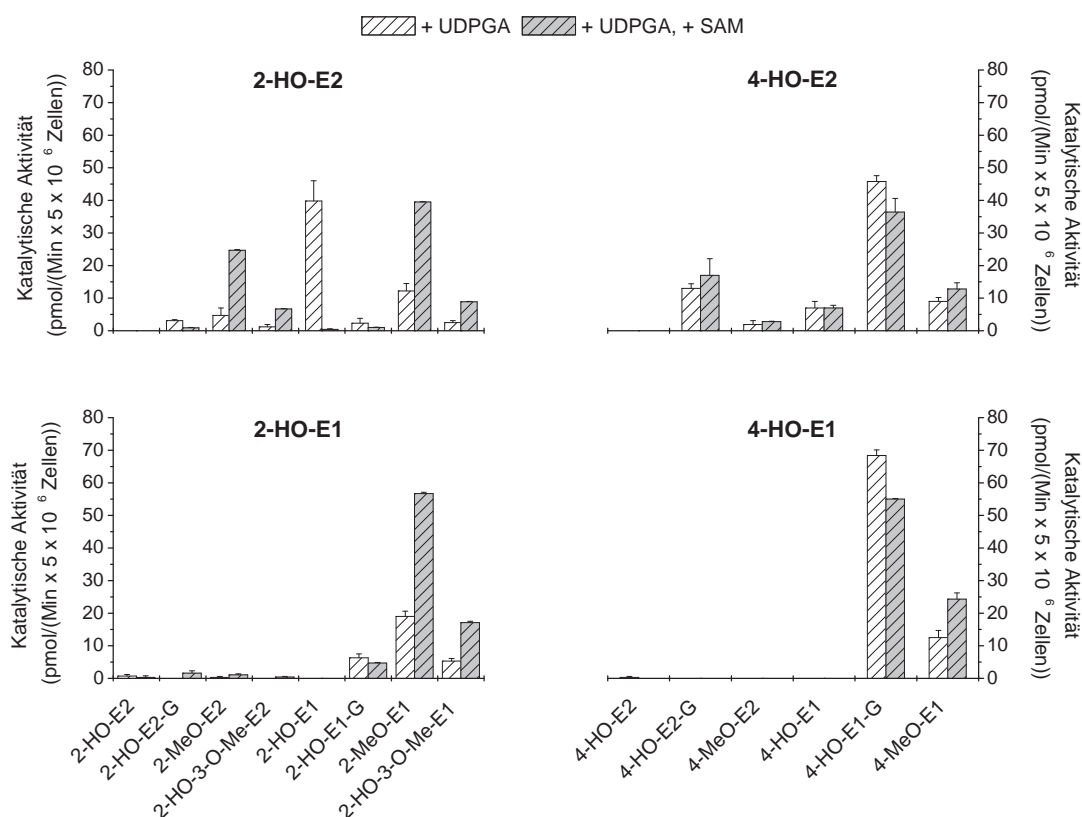


Abbildung 3.28.: Glucuronidierung der CEs ($50 \mu\text{M}$) mit HepG2-Zelllysats (50×10^6 Zellen/ml) unter Zugabe von UDPGA bzw. UDPGA und SAM als Cosubstrat. Die Inkubationszeit betrug 1 h. Die katalytische Aktivität wurde in $\text{pmol}/(\text{Min} \times 5 \times 10^6 \text{ Zellen})$ angegeben, da 5×10^6 Zellen einem Gesamtproteingehalt von 1 mg entsprechen (s. 3.1.3). Die dargestellten Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SW}$ von zwei unabhängigen Experimenten. G, Glucuronid.

Für jedes eingesetzte CE konnte, im Gegensatz zur E2-Glucuronidierung mit HepG2-Zelllysats (s. 3.1.3.2), ein zusätzlicher Peak detektiert und mittels β -Glucuronidase-Spaltung (s. 6.2.5) als Glucuronid identifiziert werden. Wiederum konnte die Position der Glucuronsäure am Steroidgerüst der CEs mangels Standardsubstanzen nicht bestimmt werden. Nach der Gewinnung des Zelllysates aus HepG2-Zellen ist darin SAM enthalten, welches das Cosubstrat für die Methylierung von Catecholen durch die COMT darstellt (s. 1.1.1.3). Die im Zelllysats vorhandene COMT ist dadurch in der Lage während der Inkubation mit UDPGA, auch ohne erneute Zugabe von SAM, Methylierungsprodukte zu erzeugen, die folglich bei der chromatographischen Analyse zusätzlich zu den Glucuroniden mittels HPLC erfasst wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.28 gezeigt. Es wird deutlich, dass 4-HO-E1, wie mit den HLM (s. Tab. 3.6), am besten glucuronidiert wurde. Es konnte mehr 4-HO-E1-Glucuronid detektiert werden als 4-MeO-E1, das Methylierungsprodukt des 4-HO-E1. Dies spricht dafür, dass 4-HO-E1 von dem HepG2-Zelllysats bevorzugt glucuronidiert wurde und nicht methyliert. Bei Umsetzungen mit 4-HO-E2 zeigte sich wieder die Umwandlung der E2-CEs in die E1-CEs durch die HSDs, weshalb auch 4-HO-E1, sein Methylierungsprodukt sowie Glucuronid nachgewiesen werden konnten. Sowohl von 4-HO-E2 als auch von 4-HO-E1 wurden hierbei vorwiegend Glucuronide detektiert. Auffällig ist, dass obwohl 4-HO-E2 eingesetzt wurde, mehr 4-HO-E1-Glucuronid als 4-HO-E2-Glucuronid vorhanden war. Dies zeigt, dass das 4-HO-E2 von dem HepG2-Zelllysats hauptsächlich in 4-HO-E1 umgewandelt und dieses wiederum über die Glucuronidierung inaktiviert wurde. Bei 2-HO-E1 als Substrat, drehte sich das Verhältnis zwischen Glucuronidierungs- und Methylierungsprodukten um, und es wurden vermehrt Methylierungsprodukte und weniger Glucuronide von 2-HO-E1 detektiert. Inkubationen mit 2-HO-E2 lieferten wiederum zusätzlich 2-HO-E1, seine Methylierungsprodukte und Glucuronide. Die katalytische Aktivität war bei den Methylierungsprodukten des 2-HO-E2 erneut höher als die des Glucuronids. Dennoch stellte hier die Umwandlung zu 2-HO-E1 und dessen Methylierung den größten Anteil dar.

Da unter den eingesetzten Bedingungen die katalytischen Aktivitäten der CE-Methylierung sehr gering waren, wurde vermutet, dass das im Zelllysats noch vorhandene SAM für die Methylierung der CEs der limitierende Faktor darstellte. Deshalb wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen nicht nur UDPGA als Cosubstrat für die Glucuronidierung, sondern auch SAM, als Cosubstrat der Methylierung, im Überschuss zugesetzt wurde. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Abbildung 3.28 gezeigt. Bei Umsetzungen mit 4-HO-E2 bzw. 4-HO-E1, die bei der Durchführung des Glucu-

ronidierungsassays mit UDPGA hauptsächlich glucuronidiert wurden, änderten sich die erhaltenen katalytischen Aktivitäten durch die zusätzliche Anwesenheit von SAM kaum, da die Methylierung bei diesen beiden CEs mit HepG2-Zelllysat eine geringe Rolle spielte. Wurden hingegen 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 als Substrate eingesetzt, konnten höhere Aktivitäten für die Methylierungsprodukte nachgewiesen werden, so dass die Differenz zwischen gebildetem Glucuronid und den jeweiligen Methylierungsprodukten noch deutlicher wurde. 2-HO-E1 lieferte hierbei höhere COMT-Aktivitäten als 2-HO-E2, das wieder in 2-HO-E1 umgewandelt und daraufhin durch dessen Methylierung inaktiviert wurde.

Der Nachweis der Glucuronide in Medium von mit CEs inkubierten HepG2-Zellen blieb aus, da keine geeignete Methode zur Analyse der polaren Glucuronide entwickelt werden konnte. Weder die saure Extraktion der Glucuronide mit Ethylacetat, das Aussalzen der Glucuronide mit Ammoniumsulfat oder die Glucuronidspaltung mit β -Glucuronidase lieferten detektierbare bzw. reproduzierbare Werte. Die Vorgehensweisen sind in 6.2.8 beschrieben.

Einfluss der Isoflavone Daidzein und Genistein auf die UGT-Aktivität

Die Isoflavone Daidzein und Genistein stellen, wie bereits in 1.2 beschrieben, Substrate der UGTs dar. Die direkte Beeinflussung der Isoflavone auf die CE-Glucuronidierung wurde mit HLM bereits in 3.1.1.2 untersucht. Bei HepG2-Zellen wurden nun Langzeitinkubationen mit den beiden Isoflavonen durchgeführt und danach der Einfluss der Isoflavone auf die UGT-Aktivität bestimmt. Dazu wurden HepG2-Zellen für 48 h mit Daidzein oder Genistein (20 μ M) inkubiert. Alle 24 h wurde das Medium abgesaugt und durch neues Medium mit Daidzein oder Genistein ersetzt (s. 6.2.6.3). Danach wurde aus diesen Zellen Zelllysate nach 6.2.6.4 hergestellt. Mit dem gewonnenen Zelllysate (50 x 10⁶ Zellen/ml) als Enzymquelle für die UGTs wurden die Glucuronidierungsexperimente wiederholt. Als Coenzym wurde nur UDPGA zugegeben. Die Bildung von Methylierungsprodukten war somit, wie bereits erläutert, aufgrund der zu geringen endogenen SAM-Konzentration im Zelllysate limitiert. In Abbildung 3.29 ist die Glucuronidierung der CEs 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 dargestellt. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle hat Daidzein die Glucuronidierung dieser beiden CEs nicht beeinflusst. Bei Zelllysate, das mit dem Isoflavon Genistein inkubiert wurde, ist bei der Glucuronidierung des 2-HO-E2 eine vermehrte Bildung des 2-HO-E2-Glucuronids und des 2-HO-E1 zu erkennen. Auch die Glucuronidierung von 2-HO-E1 konnte durch Genistein leicht gesteigert werden.

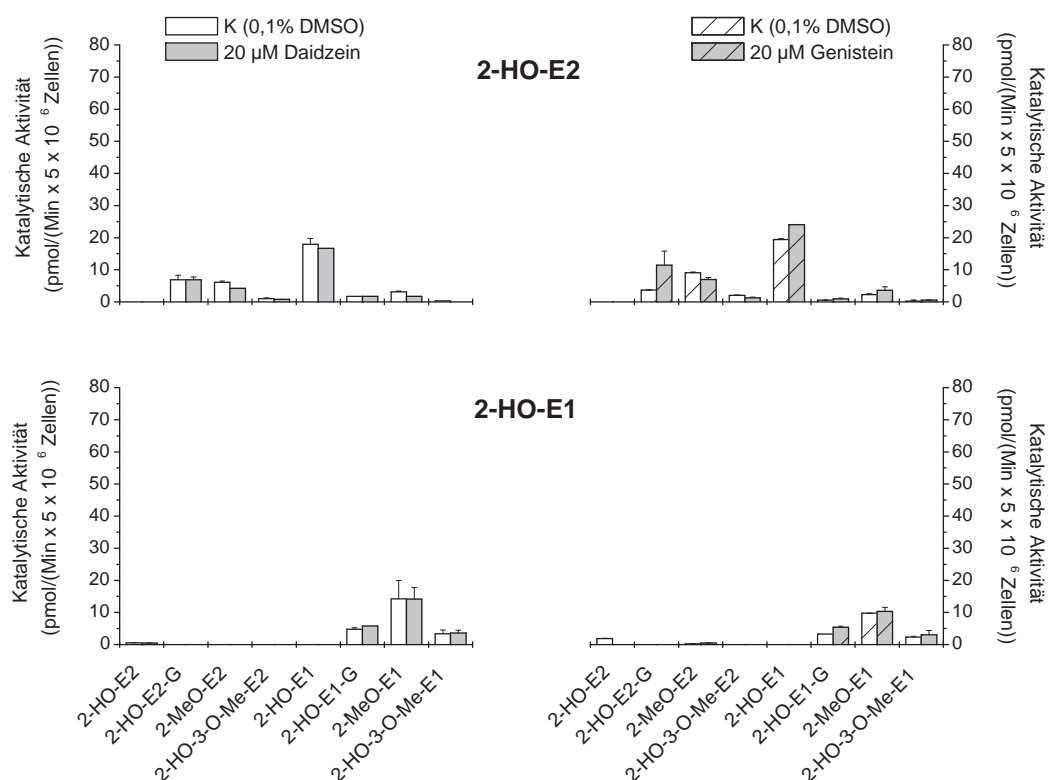


Abbildung 3.29.: Glucuronidierung der CEs 2-HO-E2 (oben) und 2-HO-E1 (unten) mit Zelllysate von HepG2-Zellen (50×10^6 Zellen/ml), die zuvor für 48 h mit Daidzein oder Genistein ($20 \mu\text{M}$) inkubiert wurden. Die CE-Konzentration betrug $50 \mu\text{M}$, die Inkubationszeit mit dem jeweiligen CE 1 h. Die katalytische Aktivität wurde in $\text{pmol}/(\text{Min} \times 5 \times 10^6 \text{ Zellen})$ angegeben, da 5×10^6 Zellen einem Gesamtproteingehalt von 1 mg entsprechen (s. 3.1.3). Die dargestellten Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SW}$ von zwei unabhängigen Experimenten. K, Kontrolle; G, Glucuronid.

Die Glucuronidierung der CEs 4-HO-E2 und 4-HO-E1 ist in Abbildung 3.30 gezeigt. Bei Verwendung des Zelllysates, das aus HepG2-Zellen hergestellt wurde, die mit Daidzein inkubiert waren, konnten bei der Glucuronidierung von 4-HO-E2 keine Unterschiede zur DMSO-Kontrolle festgestellt werden. Bei der Glucuronidierung von 4-HO-E1 wurde etwas mehr 4-HO-E1-Glucuronid und etwas weniger 4-MeO-E1 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle detektiert. Genistein erhöhte bei Inkubationen mit 4-HO-E2 die Bildung des 4-HO-E2-Glucuronids, aber auch der Gehalt an 4-HO-E1 und dessen Glucuronid bzw. Methylierungsprodukt 4-MeO-E1 war höher als bei der

DMSO-Kontrolle. Die Glucuronidierung von 4-HO-E1 wurde von Genistein nicht beeinflusst. Vergleicht man die erhaltenen Werte der DMSO-Kontrollen mit den Ergebnissen in Abbildung 3.28 (mit UDPGA als Coenzym, aber ohne SAM) konnten diese bestätigt werden.

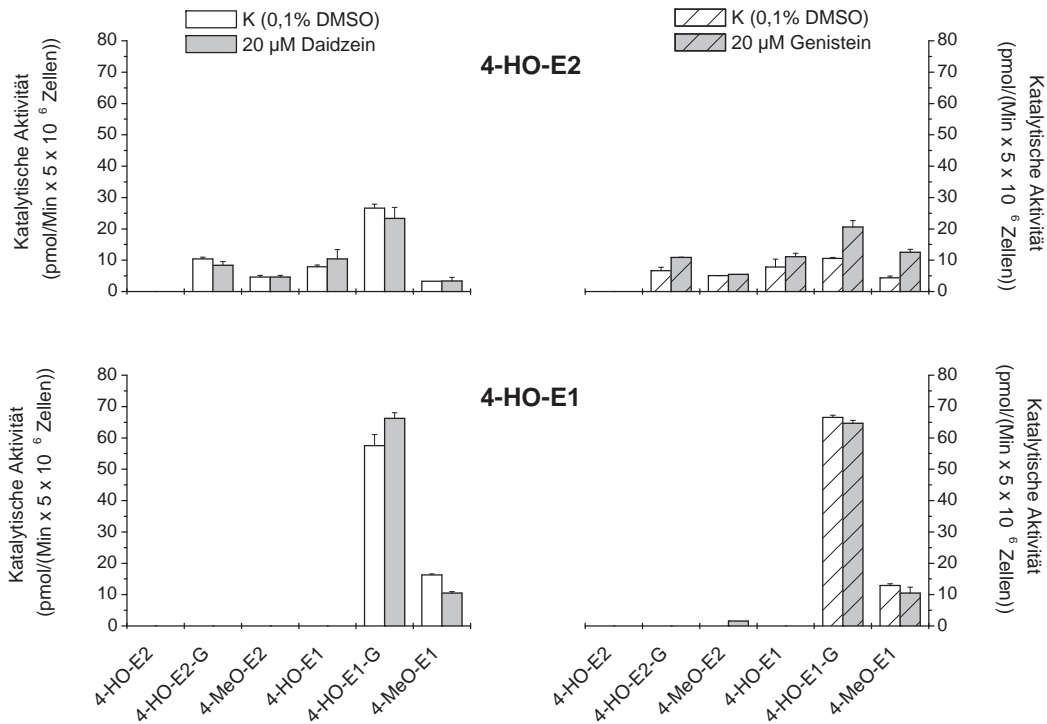


Abbildung 3.30.: Glucuronidierung der CEs 4-HO-E2 (oben) und 4-HO-E1 (unten) mit Zelllysate von HepG2-Zellen (50×10^6 Zellen/ml), die zuvor für 48 h mit Daidzein oder Genistein ($20 \mu\text{M}$) inkubiert wurden. Die CE-Konzentration betrug $50 \mu\text{M}$, die Inkubationszeit mit dem jeweiligen CE 1 h. Die katalytische Aktivität wurde in $\text{pmol}/(\text{Min} \times 5 \times 10^6 \text{ Zellen})$ angegeben, da 5×10^6 Zellen einem Gesamtproteingehalt von 1 mg entsprechen (s. 3.1.3). Die dargestellten Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SW}$ von zwei unabhängigen Experimenten. K, Kontrolle; G, Glucuronid.

Bei den durchgeführten Experimenten fiel auf, dass Genistein sich in den HepG2-Zellen über die Zeitspanne von 48 h anreicherte. Im Zelllysate dieser Zellen (50×10^6 Zellen/ml), das für die Glucuronidierung der CEs eingesetzt wurde, konnten noch $0,6 \pm 0,09 \text{ nmol}$ Genistein detektiert werden. Die Anreicherung von Daidzein im Zelllysate fiel dagegen gering aus, der Gehalt im Zelllysate war um das Zehnfache niedriger

als bei Genistein. Aufgrund der Strukturformel des Genisteins (Abbildung 1.10) kann Genistein an drei Positionen glucuronidiert werden. Somit wäre zusätzlich eine direkte Beeinflussung der Glucuronidierung der vier CEs durch Genistein und umgekehrt denkbar. Deshalb wurde auch die Glucuronidierung von Genistein mit Zelllysats (50 x 10⁶ Zellen/ml) aus HepG2-Zellen, die zuvor 48 h mit Genistein (20 µM) inkubiert wurden, als Substrat- bzw. Proteinquelle analysiert. Dazu wurde das mit Genistein angereicherte HepG2-Zelllysats für 1 h unter Anwesenheit des Cosubstrates UDPGA glucuronidiert. Es wurden zwei zusätzliche Peaks erhalten, die beide durch Spaltung mit β -Glucuronidase in Natriumacetat-Puffer (pH 5,0) als Glucuronide des Genisteins identifiziert werden konnten (Durchführung s. 6.2.5). Das im Zelllysats vorhandene Genistein wurde sehr gut glucuronidiert, so dass nach 1 h 81% als Glucuronide vorlagen (Abbildung 3.31). Im Inkubationsmedium war Genistein für die Dauer der Umsetzung stabil. Dies wurde anhand von Inkubationen ohne UDPGA abgesichert. In Anwesenheit eines CE nahm die Glucuronidierung sehr stark ab. Zusammen mit 2-HO-E2, 2-HO-E1 oder 4-HO-E2 betrug der Umsatz lediglich noch zwischen 7 und 11%. Außerdem wurde nur noch ein Glucuronid gefunden. Beim Zusatz von 4-HO-E1 lagen 37% als Glucuronide vor, wobei zwei Glucuronide detektiert werden konnten.

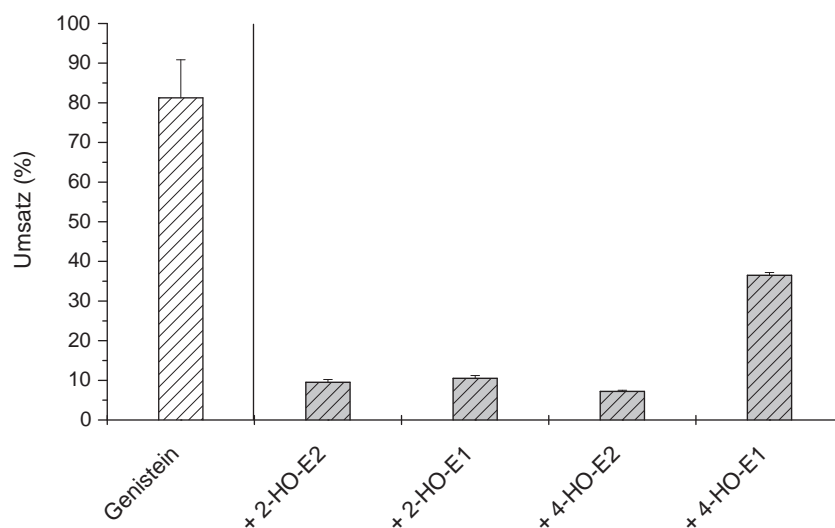


Abbildung 3.31.: Glucuronidierung von Genistein ohne bzw. in Anwesenheit eines CE (50 µM) mit Zelllysats von HepG2-Zellen (50 x 10⁶ Zellen/ml), die zuvor für 48 h mit Genistein (20 µM) inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit UDPGA als Cosubstrat betrug 1 h. Die dargestellten Werte repräsentieren MW \pm SW von zwei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der CE-Glucuronidierung mit HLM, dass die CEs bessere Substrate für die UGTs darstellten als E2. Untersuchungen mit HepG2-Zellysat bestätigten, dass 2-HO-E2 und 2-HO-E1 vorzugsweise durch Methylierung inaktiviert wurden, wobei 2-HO-E2 vor allem den Weg über das 2-HO-E1 und dessen Methylierung einschlug. Dagegen wurden 4-HO-E2 und 4-HO-E1 vorwiegend glucuronidiert und kaum methyliert. Auch hier wurde 4-HO-E2 zu 4-HO-E1 umgewandelt, welches anschließend glucuronidiert wurde. Der Einfluss von Daidzein auf die UGT-Aktivität in HepG2-Zellen war gering. Es wurde nur die Glucuronidierung von 4-HO-E1 leicht erhöht. Genistein steigerte hingegen die Glucuronidierung von 2-HO-E2, 2-HO-E1 und 4-HO-E2. Die Glucuronidierung von 4-HO-E1 wurde nicht beeinflusst. Außerdem konnte durch Genistein eine etwas stärkere Umwandlung der E2-CEs in die E1-CEs durch HSDs erhalten werden. Durch die Anreicherung des Genisteins in den HepG2-Zellen wurde die Glucuronidierung der CEs nicht gehemmt. Jedoch wurde in Anwesenheit der CEs die Glucuronidierung des Genisteins stark vermindert.

3.3. Untersuchungen zur Genotoxizität der CEs

3.3.1. Messung von DNA-Strangbrüchen in kultivierten Zelllinien

Die Genotoxizität der CEs wurde anhand von DNA-Strangbrüchen erfasst. Eine geeignete Methode zur Messung der DNA-Strangbrüche stellt die AU dar, bei der die DNA durch Zugabe einer alkalischen Lösung entwunden und durch eine Ultraschallbehandlung fragmentiert wird. Die erhaltenen einzel- bzw. doppelsträngigen DNA-Bruchstücke werden chromatographisch getrennt und mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes detektiert (s. 6.2.10.1). Die Zelllinien, in denen die CE-Genotoxizität untersucht wurde, wurden entsprechend ihrer Fähigkeit, die CEs zu metabolisieren, ausgewählt. Die V79-Zellen stellten die Zellen mit den geringsten metabolischen Eigenschaften dar (s. 3.2.1.2). Zusätzlich wurden MCF-7-Zellen, welche die CEs nur methylieren konnten, verwendet. Die dritte Zelllinie, die eingesetzt wurde, waren HepG2-Zellen. Neben der CE-Methylierung sowie der Oxidation der E2-CEs zu ihren E1-CEs wurde mit diesen Zellen auch die CE-Glucuronidierung nachgewiesen (s. 3.2.1.3 und 3.2.2). Es wurden zwischen 1×10^5 und $1,4 \times 10^5$ Zellen ausgestreut. Die eingesetzten CE-Konzentrationen betrugen zwischen 5 und $50 \mu\text{M}$, die Inkubationszeiten je nach Zelllinie 1,5 bzw. 3 h. Da das Flavonol Quercetin auch eine catecholische Struktur aufweist (s. Abbildung 3.18), wurde dessen Potential DNA-Strangbrüche zu induzieren

zum Vergleich mitbestimmt. Als Positivkontrolle diente t-BuOOH. Die Ergebnisse von t-BuOOH und Quercetin (jeweils 50 μ M) sind in Abbildung 3.32 dargestellt. Auf der linken Seite ist die Anzahl der induzierten DNA-Strangbrüche pro Zelle abgebildet.

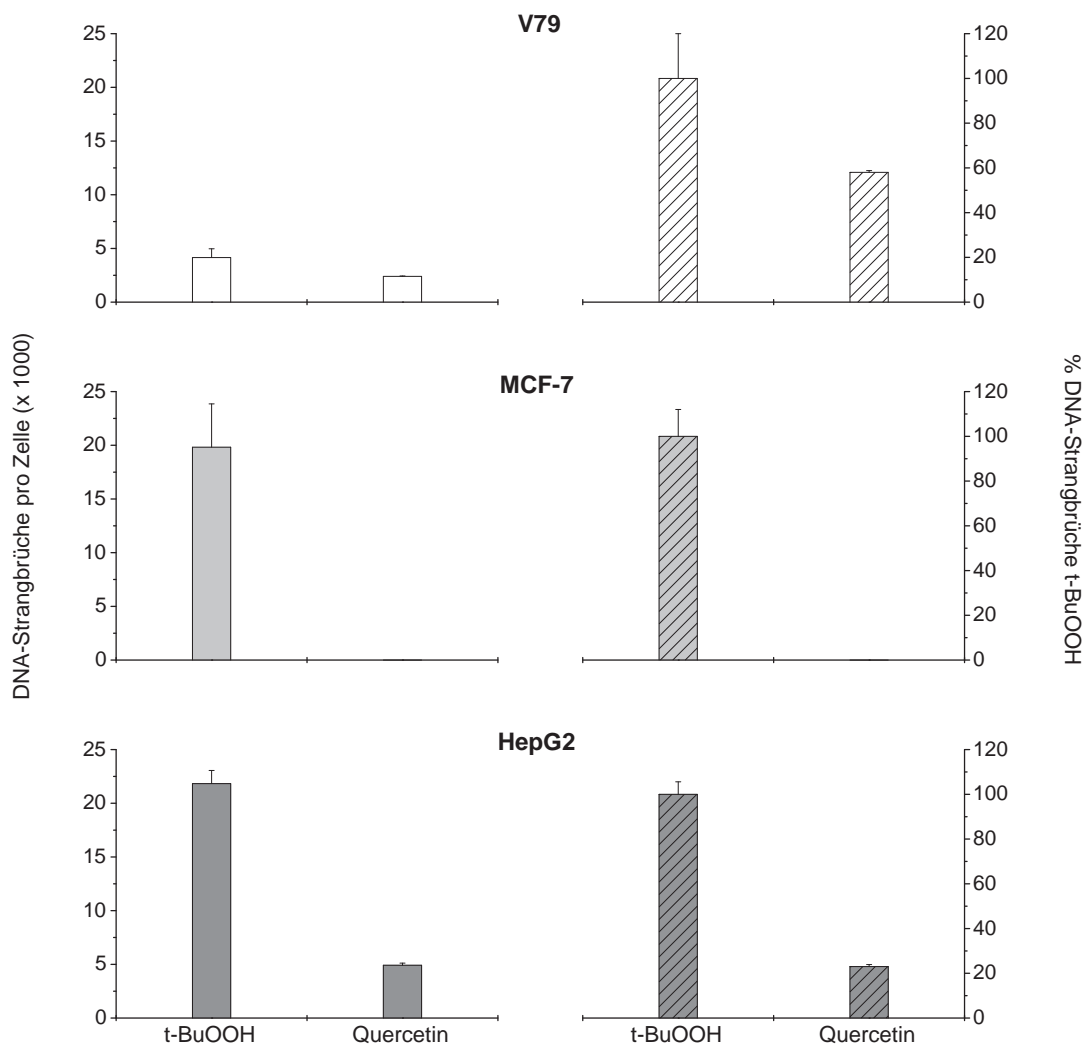


Abbildung 3.32.: Durch t-BuOOH (50 μ M) und Quercetin (50 μ M) induzierte DNA-Strangbrüche pro Zelle (links) in V79-, MCF-7- sowie HepG2-Zellen. Die Inkubationszeit betrug 1,5 h (V79) bzw. 3 h (HepG2 und MCF-7). Rechts wurden die durch Quercetin induzierten DNA-Strangbrüche pro Zelle auf die durch t-BuOOH erhaltenen normiert. Die Werte repräsentieren MW \pm SA von drei unabhängigen Experimenten.

Es wird deutlich, dass die Zellen ganz unterschiedlich auf die verwendeten Substanzen ansprachen. In V79-Zellen waren die induzierten Strangbrüche sowohl bei t-BuOOH als auch bei Quercetin sehr niedrig. Dagegen war die Anzahl an induzierten Strangbrüchen durch t-BuOOH in MCF-7- und HepG2-Zellen ähnlich und deutlich höher als in V79-Zellen. Das Flavonol Quercetin erzeugte in HepG2-Zellen viel weniger Strangbrüche als t-BuOOH. In MCF-7-Zellen konnten überhaupt keine Strangbrüche bei Inkubationen mit Quercetin erhalten werden. Auf der rechten Seite sind die jeweiligen durch t-BuOOH induzierten DNA-Strangbrüche als 100% gesetzt und die von Quercetin erzeugten Strangbrüche auf diese normiert worden. Hierbei erkennt man, dass in V79-Zellen, im Verhältnis zum t-BuOOH, durch Quercetin mehr DNA-Strangbrüche induziert wurden als in HepG2-Zellen, obwohl in HepG2-Zellen die absolute Anzahl an DNA-Strangbrüchen höher war.

Die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Quercetin ist noch umstritten. Es gibt Studien, die diese belegen und andere, die das Gegenteil zeigen [da Silva et al. (2002); Harwood et al. (2007); Waetjen et al. (2005)]. Aufgrund seiner Catecholstruktur sind jedoch eine Oxidation zum Chinon, nachfolgendes Redoxcycling und daraus resultierende DNA-Strangbrüche denkbar.

Abbildung 3.33 zeigt die Ergebnisse für die CEs. Die meisten DNA-Strangbrüche wurden in V79-Zellen, welche die CEs am wenigsten metabolisierten, bestimmt. Dies wurde durch die Ergebnisse von t-BuOOH bzw. Quercetin noch verstärkt, da in dieser Zelllinie die Sensitivität für die verwendeten Substanzen am geringsten war (Abbildung 3.32). Alle vier eingesetzten CEs induzierten in V79-Zellen konzentrationsabhängig DNA-Strangbrüche, wobei durch Behandlungen mit den beiden E2-CEs mehr DNA-Strangbrüche detektiert wurden als mit den E1-CEs. MCF-7-Zellen waren in der Lage, die CEs zu methylieren (s. 3.2.1.3). Auch hier konnten DNA-Strangbrüche gemessen werden, jedoch weniger als in V79-Zellen. Die meisten Strangbrüche wurden bei Inkubationen mit 4-HO-E2 bzw. 4-HO-E1 erhalten. Am wenigsten Strangbrüche wurden in HepG2-Zellen induziert. Wie in 3.2.1.3 sowie in 3.2.2 beschrieben, konnten diese Zellen die CEs gut methylieren, glucuronidieren und besaßen aktive HSDs, weshalb bei keinem CE, außer bei Behandlungen mit 4-HO-E1, messbare DNA-Strangbrüche erzielt wurden. Die negativen Werte kommen durch die Berechnung der Anzahl an DNA-Strangbrüche pro Zelle zustande (s. 6.2.10.1) und sind gleichzusetzen damit, dass keine DNA-Strangbrüche induziert wurden.

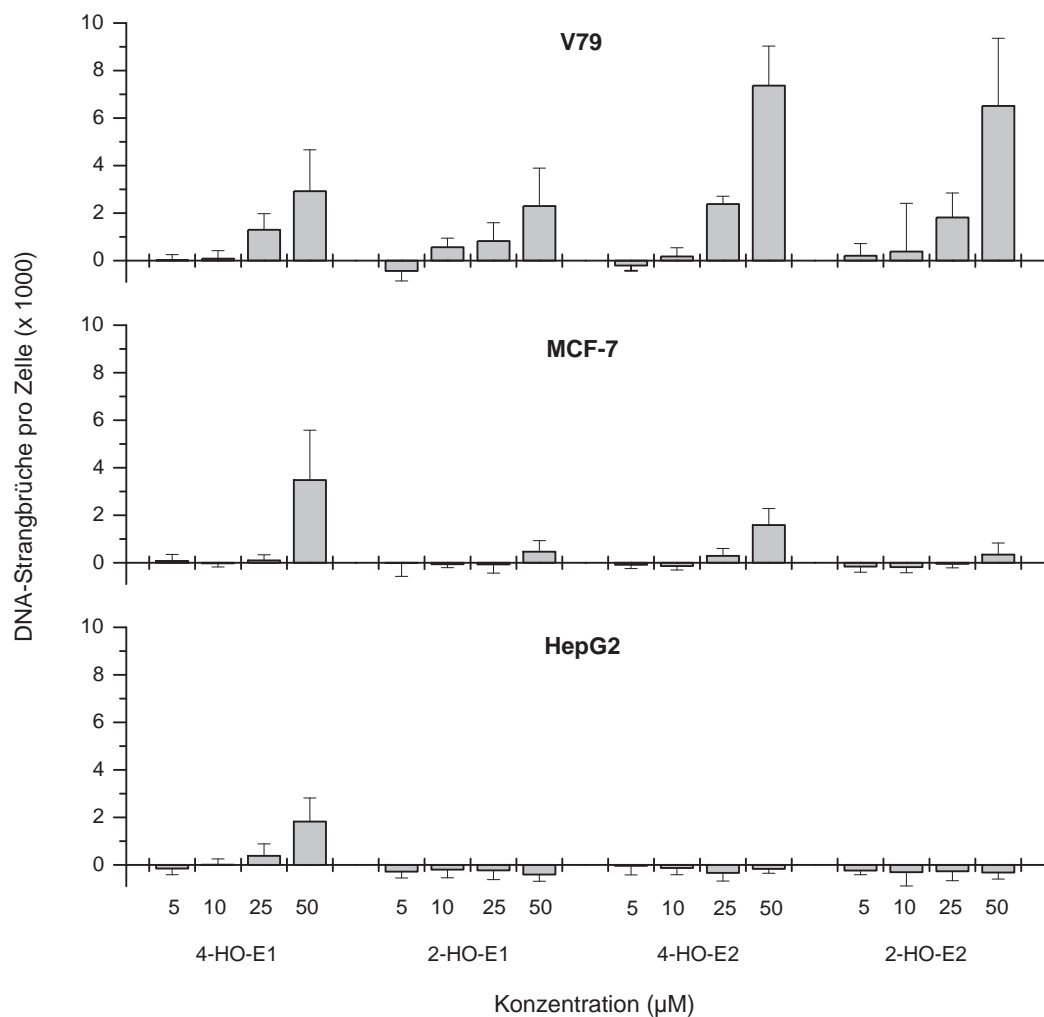


Abbildung 3.33.: Durch CEs (5 - 50 µM) induzierte DNA-Strangbrüche pro Zelle in V79-, MCF-7- sowie HepG2-Zellen. Die Inkubationszeit betrug 1,5 h (V79-Zellen) bzw. 3 h (HepG2- und MCF-7-Zellen). Die dargestellten Werte repräsentieren MW ± SA von drei unabhängigen Experimenten.

3.3.2. Messung von DNA-Strangbrüchen in Kalbsthymus-DNA

Die Untersuchung der Induktion von DNA-Strangbrüchen durch CE in V79-Zellen zeigte Unterschiede im strangbrechenden Potential der E2-CEs und E1-CEs (s. 3.3.1). Um herauszufinden, ob diese Unterschiede ausschließlich den CE zuzuschreiben sind oder, ob zelluläre Einflüsse dabei noch eine Rolle spielen, wurde die Strangbruchrate,

induziert durch CEs, im zellfreien System gemessen. Hierfür wurde die Methode der AU (s. 6.2.10.1) auf reine Kalbsthymus-DNA übertragen.

3.3.2.1. Etablierung der AU von Kalbsthymus-DNA

Zuerst musste der Einfluss aller unten aufgelisteten Parameter auf den Anteil an doppelsträngiger DNA überprüft werden. Diese Untersuchungen wurden ohne Substanzzugabe durchgeführt. Variiert wurden:

- Menge an Kalbsthymus-DNA: 5 µg; 10 µg; 50 µg; 100 µg; 300 µg
- Menge an alkalischer Lösung: 0,5 ml; 1,5 ml
- Zeit der Ultraschallbehandlung: 15 sec; 30 sec; 45 sec; 60 sec
- Entwindungszeit der Kalbsthymus-DNA: 3 Min; 5 Min; 10 Min; 20 Min; 30 Min
- pH-Wert der alkalischen Lösung: 10,7 - 11,7

Es wurde festgestellt, dass die Menge an alkalischer Lösung kaum Auswirkungen auf die Anzahl an doppelsträngiger DNA hatte, weshalb weiterhin 1,5 ml alkalische Lösung zum Entwinden verwendet wurden. Auch die Verlängerung der Ultraschallzeit blieb ohne Effekt auf die detektierte Menge an doppelsträngiger DNA. Wie Abbildung 3.34 zeigt, spielte der pH-Wert der alkalischen Lösung und auch die Entwindungszeit bei der Etablierung der Methode eine große Rolle. Deshalb wurden bei der Ermittlung des optimalen pH-Wertes nur sehr geringe pH-Abstufungen gewählt. Es wurde versucht, Bedingungen zu finden, bei denen der Anteil an doppelsträngiger DNA ohne Substanzzugabe zwischen 65 und 75% lag. Ein zu hoher Gehalt an doppelsträngiger DNA könnte dazu führen, dass die DNA nicht ausreichend entwunden wird, und bei einem zu niedrigen Gehalt, wäre die DNA bereits ohne Substanzzugabe zu stark geschädigt. In Abbildung 3.34 konnte dies erfüllt werden, wenn 100 µg der Kalbsthymus-DNA bei einem pH-Wert von 11,48 für 30 Min entwunden wurden oder, wenn die Entwindung der Kalbsthymus-DNA bei einem pH-Wert der alkalischen Lösung von 11,56 für eine Dauer von 20 Min durchgeführt wurde. Für die nachfolgenden Versuche wurde die erste Variante (pH 11,48, Entwindungszeit 30 Min) verwendet. Die genaue Durchführung ist in 6.2.11 beschrieben.

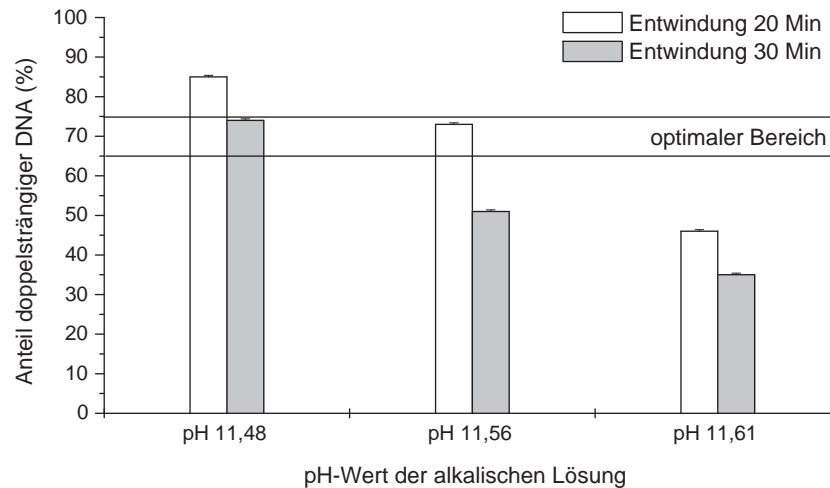


Abbildung 3.34.: Anteil an doppelsträngiger DNA nach AU von 100 μg Kalbsthymus-DNA. Der pH-Wert der alkalischen Lösung sowie die Entwindungszeit wurden variiert. Die dargestellten Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SA}$ einer Dreifachbestimmung eines Versuches.

Nachdem die Bedingungen für eine gute Kontrolle ermittelt wurden, wurde die festgelegte Vorgehensweise mit Substanzzugabe auf ihre Funktionalität hin überprüft. Dazu wurde die Kalbsthymus-DNA (100 μg) für 15 Min bzw. 1 h bei 37°C mit Menadion (2,5 - 20 μM), t-BuOOH (50 μM - 1 mM) oder H_2O_2 (500 μM - 2 M) inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Katalase (100 U/ml) gestoppt und die AU durchgeführt. Bei Menadion und bei t-BuOOH konnten unter diesen Bedingungen keine DNA-Strangbrüche detektiert werden. Der Nachweis von DNA-Strangbrüchen gelang nur bei Inkubationen mit H_2O_2 in sehr hohen Konzentrationen (0,1 - 2 M) bei einer Inkubationszeit von 1 h. Unter diesen Verhältnissen stieg der Anteil an einzelsträngiger DNA konzentrationsabhängig an (s. Abbildung 3.35, links). Der Anteil an einzelsträngiger DNA stellt hierbei ein Maß für die induzierten DNA-Strangbrüche dar. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Methode der AU durch die neu gewählten Parameter auch an reiner Kalbsthymus-DNA anwendbar ist, jedoch war sie unter diesen Bedingungen noch zu unempfindlich.

Um die Empfindlichkeit der Messung von DNA-Strangbrüchen mittels AU von Kalbsthymus-DNA zu erhöhen, wurde bei den Inkubationen CuCl_2 (25 bzw. 50 μM) zugesetzt und dadurch der Prozess des Redoxcyclings aktiviert. Wie in Abbildung 3.35 (rechte Seite) gezeigt, konnte durch den Zusatz von Cu^{2+} bei deutlich niedrige-

ren H_2O_2 -Konzentrationen eine Zunahme der einzelsträngigen DNA detektiert werden. Die Verdoppelung der CuCl_2 -Konzentration auf $50\text{ }\mu\text{M}$ brachte keine zusätzliche Erhöhung der Strangbruchrate, so dass bei den folgenden Experimenten mit einer CuCl_2 -Konzentration von $25\text{ }\mu\text{M}$ gearbeitet wurde. Gab man neben Cu^{2+} zusätzlich noch $\text{NADH} + \text{H}^+$ ($100\text{ }\mu\text{M}$) in den Inkubationsansatz, war die DNA so stark geschädigt, dass keine doppelsträngige DNA mehr detektiert werden konnte. Der Zusatz von Cu^{2+} zusammen mit $\text{NADH} + \text{H}^+$ scheint somit die Empfindlichkeit der AU im System Kalbsthymus-DNA stark zu erhöhen.

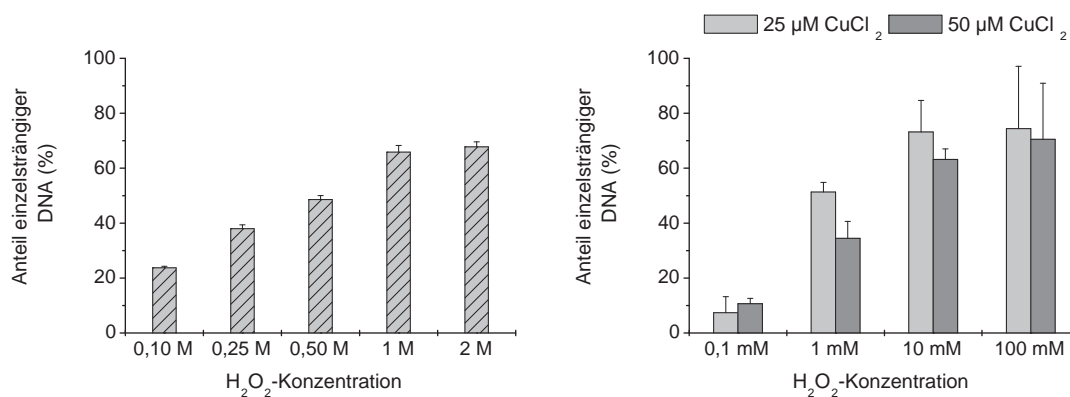


Abbildung 3.35.: Zunahme an einzelsträngiger DNA nach 1-stündiger Inkubation von Kalbsthymus-DNA ($100\text{ }\mu\text{g}$) mit H_2O_2 (links) bzw. mit H_2O_2 und CuCl_2 (25 bzw. $50\text{ }\mu\text{M}$), dargestellt auf der rechten Seite. Die Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SA}$ einer Dreifachbestimmung eines Versuches.

3.3.2.2. Messung der Induktion von DNA-Strangbrüchen durch CEs an Kalbsthymus-DNA

Nach Etablierung der AU (s. 6.2.11) wurde nun die Induktion der DNA-Strangbrüche durch CEs an Kalbsthymus-DNA untersucht. Dazu wurde die in 3.3.1 höchste eingesetzte CE-Konzentration ($50\text{ }\mu\text{M}$) verwendet und zusammen mit der Kalbsthymus-DNA ($100\text{ }\mu\text{g}$) sowie CuCl_2 ($25\text{ }\mu\text{M}$) und $\text{NADH} + \text{H}^+$ ($100\text{ }\mu\text{M}$) für 1 bzw. 2 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Katalase (100 U/ml) abgestoppt, danach erfolgte die AU. Bei allen vier CEs konnte eine Zunahme der einzelsträngigen DNA in der gleichen Größenordnung nachgewiesen werden (Abbildung 3.36), wobei die Zunahme der einzelsträngigen DNA ein Maß für die Induktion von

DNA-Strangbrüchen darstellt. Die Menge an detektierter einzelsträngiger DNA konnte bei Verdoppelung der Inkubationszeit auf 2 h weiter erhöht werden. Es wurde dabei eine 2 - 2,5-fach größere Anzahl an einzelsträngiger DNA gemessen als bei einer Inkubationszeit von 1 h. Die Steigerung war bei allen vier CEs ungefähr gleich hoch.

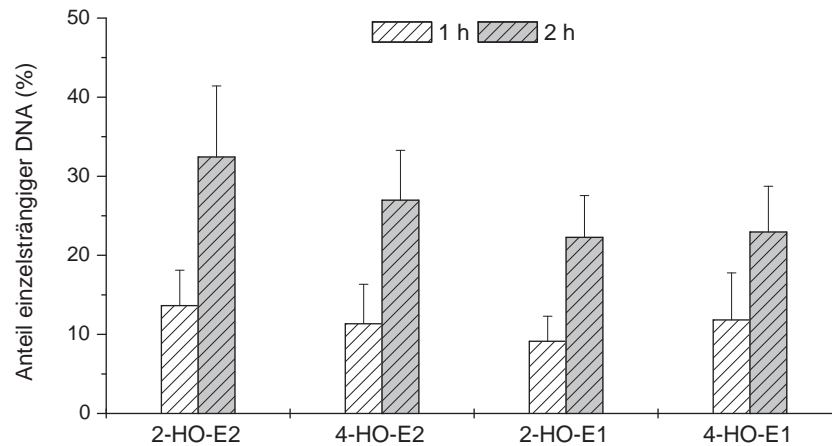


Abbildung 3.36.: Anteil an einzelsträngiger DNA nach 1- bzw. 2-stündiger Inkubation von Kalbsthymus-DNA (100 µg) mit den CEs (50 µM), CuCl₂ (25 µM) und NADH + H⁺ (100 µM). Die dargestellten Werte repräsentieren MW ± SA von drei unabhängigen Experimenten.

Die untersuchten CEs verhielten sich somit bei Inkubationen mit reiner Kalbsthymus-DNA ähnlich und führten zu einer Erhöhung der detektierten Menge an einzelsträngiger DNA. Daraus kann geschlossen werden, dass in V79-Zellen die gemessenen Unterschiede in der DNA-Strangbruchrate zwischen den E2- bzw. E1-CEs auf das Zusammenspiel verschiedener zellulärer Effekte und den CEs zurückzuführen ist (s. 3.3.1). Außerdem zeigen diese Ergebnisse, dass die in 3.3.1 gemessenen DNA-Strangbrüche in den Zellen keine Artefakte waren, verursacht durch cytotoxische Effekte beim Einsatz sehr hoher, nicht-physiologischer CE-Konzentrationen (50 µM).

3.3.3. Messung von DNA-Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden in kultivierten Zelllinien

Da durch die Methode der AU (Methode A, s. 6.2.10.1) in 3.3.1 nur sehr wenige DNA-Strangbrüche, vor allem in MCF-7- und HepG2-Zellen, gemessen werden konnten, wurde nach Wegen gesucht, die DNA-Schäden zu erhöhen und dadurch besser

detektierbare Mengen an DNA-Strangbrüchen zu erzielen. Eine Möglichkeit dafür, stellt die Miterfassung der oxidativen DNA-Schäden zusätzlich zu den induzierten DNA-Strangbrüchen dar. Dies lässt sich erreichen, in dem man die AU mit dem Einsatz des bakteriellen Reparaturenzyms Fpg kombiniert (Methode B, s. 6.2.10.2). Die oxidativen Schäden werden durch das Fpg-Reparaturenzym in Strangbrüche umgewandelt und können so mittels der Methode der AU detektiert werden (s. auch 1.1.4). Die Gesamtmenge an DNA-Schäden steigt dadurch bei Substanzen, die, wie die CEs, neben Strangbrüchen auch oxidative DNA-Schäden erzeugen, an.

Zur Etablierung der Methode wurden V79-Zellen 1, 5 h mit Menadion (10 - 20 μM), das sowohl DNA-Strangbrüche als auch oxidative DNA-Schäden verursacht, inkubiert. Anschließend erfolgte die Erfassung der induzierten Strangbrüche ohne Einsatz von Fpg (Methode A, s. 6.2.10.1) bzw. mit Zusatz von Fpg (Methode B, s. 6.2.10.2), um beide Methoden miteinander vergleichen zu können. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 3.37.

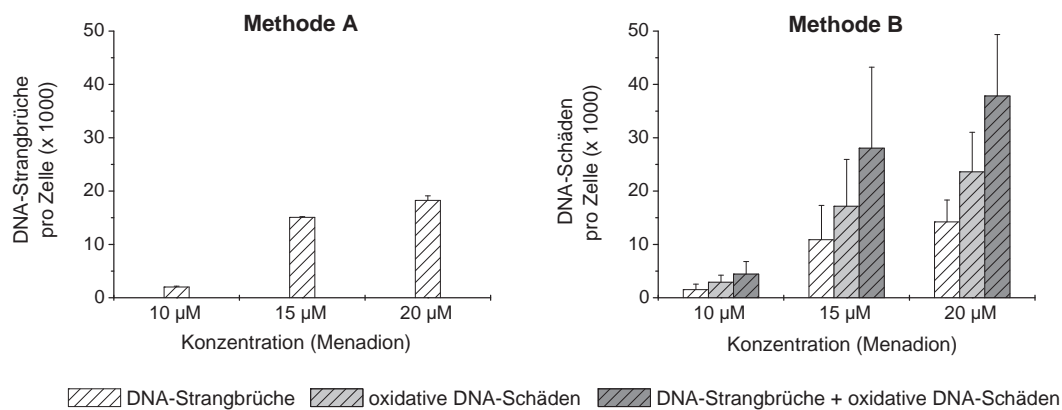


Abbildung 3.37.: DNA-Schäden in V79-Zellen inkubiert mit Menadion (10 - 20 μM). Links sind die DNA-Strangbrüche pro Zelle, erfasst mit Methode A, dargestellt. Auf der rechten Seite sind die erhaltenen DNA-Strangbrüche, oxidativen DNA-Schäden sowie die Summe aus beidem nach Methode B aufgezeigt. Die dargestellten Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SA}$ einer Dreifachbestimmung eines Versuches.

Mit Methode A wurden in V79-Zellen konzentrationsabhängig DNA-Strangbrüche detektiert. Dies konnte auch mit Methode B erreicht werden. Die erhaltenen Mengen an DNA-Strangbrüchen waren etwas niedriger, aber noch vergleichbar mit den bei Methode A gezeigten. Die erfassten oxidativen DNA-Schäden lagen bei allen eingesetzten

Menadionkonzentrationen höher als die Strangbrüche, so dass in der Summe mit Methode B mehr als doppelt so viele DNA-Schäden erhalten werden konnten. Methode B (Durchführung s. 6.2.10.2) lieferte somit vergleichbare DNA-Strangbruchraten wie Methode A und konnte deshalb zur zusätzlichen Erfassung oxidativer Schäden eingesetzt werden.

Beim Einsatz von Quercetin bzw. den CEs (jeweils 50 μM) konnten jedoch die mit Methode A detektierten DNA-Strangbrüche bei Verwendung von Methode B nicht reproduziert werden. Es wurden deutlich weniger DNA-Strangbrüche mit Methode B erhalten (Abbildung 3.38). Wie beim Menadion wurden etwas mehr oxidative DNA-Schäden als DNA-Strangbrüche induziert, jedoch war bei diesen Substanzen sogar die Summe aus Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden geringer als die mit Methode A detektierten DNA-Strangbrüche. Bei Inkubationen mit dem CE 4-HO-E1 konnten überhaupt keine DNA-Strangbrüche detektiert werden. Auch hier ist die Berechnung (s. 6.2.10.2) Ursache für die negativen Werte, welche damit gleichzusetzen sind, dass keine DNA-Schäden nachgewiesen wurden.

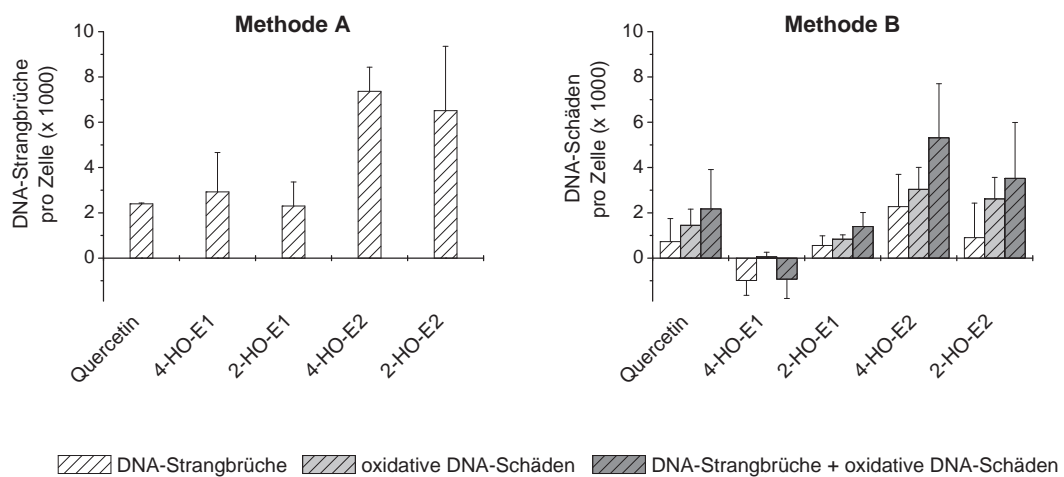


Abbildung 3.38.: DNA-Schäden in V79-Zellen inkubiert mit Quercetin bzw. mit den vier CEs (50 μM). Links sind die mit Methode A detektierten DNA-Strangbrüche pro Zelle dargestellt. Auf der rechten Seite wurden die erhaltenen DNA-Strangbrüche, oxidativen DNA-Schäden sowie die resultierende Summe aus beidem nach Methode B aufgezeigt. Die Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SW}$ von zwei unabhängigen Experimenten.

Somit lieferte die Miterfassung der oxidativen DNA-Schäden mittels Fpg nur für Substanzen welche, wie das Menadion, die DNA sehr stark schädigten, reproduzierbare

Werte. Für Substanzen, die weniger potent waren, z.B. das Quercetin und die CEs, ist diese Methode ungeeignet.

3.3.4. Untersuchungen mit Liposomen

Neben der in 3.3.3 beschriebenen Methode wurde als weitere Möglichkeit, um die Anzahl an DNA-Schäden zu erhöhen, die Verpackung von Catecholen in Liposomen untersucht. Liposomen bestehen aus einer oder mehreren konzentrischen Lipiddoppelschichten mit wässrigem Innenraum. Sie ähneln in ihrem Aufbau den Zellmembranen, weshalb Substanzen, die in Liposomen eingeschlossen sind, in Zellen eingeschleust und dadurch ihre Konzentrationen in den Zellen erhöht werden können (s. 1.1.5). Wie in 3.2.1.3 gezeigt, sind Substanzen mit catecholischer Struktur, z.B. Quercetin oder die CEs, sehr reaktiv. Ihr Anteil im Zellkulturmedium nimmt sehr schnell ab, so dass man davon ausgehen kann, dass ihr Gehalt in den Zellen auch sehr gering ist. Durch Verpackung dieser Substanzen in Liposomen wurde nun geprüft, ob die Menge an Catecholen in den Zellen im Vergleich zu Inkubationen ohne Liposomen zunimmt und, ob die Anzahl an DNA-Schäden dadurch erhöht werden kann.

3.3.4.1. Herstellung der Liposomen

Die Liposomen wurden mit Hilfe eines käuflich erwerbbaren Liposomenkits, das sich aus Phosphatidylcholin (63 μmol), Stearylamin (18 μmol) und Cholesterol (9 μM) zusammensetzt, hergestellt. Um die Methode der Liposomenherstellung zu etablieren, wurden zuerst Liposomen erzeugt, die keine Substanz enthielten. An diesen wurde die Länge der Ultraschallbehandlung optimiert, welche dazu dient, kleine Liposomen zu erhalten, die von den Zellen aufgenommen werden können. Außerdem wurde anhand dieser Liposomen deren Stabilität in dem verwendeten Kaliumphosphat-Puffer (mit 0,15 M NaCl, pH 7,4) über mehrere Wochen beobachtet. Anschließend wurden Liposomen hergestellt, die als Modellcatechol Quercetin enthielten (L(Quercetin)). Hierzu wurde das Liposomenkit in Chloroform und das Quercetin in Ethanol gelöst. Ein Aliquot der Quercetinlösung, das sich nach der gewünschten Quercetinkonzentration in den Liposomen richtete, wurde zu der Chloroformlösung pipettiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit Stickstoff beströmt, um die Lipidperoxidation durch Luftsauerstoff zu minimieren. Nachdem der Rückstand in Kaliumphosphat-Puffer aufgenommen wurde, folgte das Vortexen des Gemisches für zehn Minuten. Die Liposomensuspension wurde dann zur besseren Wei-

terverarbeitung aliquotiert und mit der Ultraschallspitze behandelt. Der etablierte Versuchsablauf findet sich unter 6.2.12.1.

3.3.4.2. Beeinflussung der Aufnahme von Quercetin in kultivierte V79-Zellen durch Liposomen

Nachdem L(Quercetin) hergestellt worden sind, erfolgte die Überprüfung der Aufnahme dieser Liposomen in V79-Zellen. Dazu wurden 3×10^6 V79-Zellen mit L(Quercetin) ($c(\text{Quercetin}) = 50 \mu\text{M}$) inkubiert. Parallel dazu wurden V79-Zellen mit Quercetin ohne Liposomen ($50 \mu\text{M}$) auf dessen Aufnahme in die Zellen untersucht. Die Inkubationszeiten betrugen anfänglich 30, 60 und 90 Min, um die Zeitabhängigkeit der Quercetinaufnahme in die Zellen zu bestimmen. Dabei ergab sich kein wesentlicher Unterschied zwischen der Inkubationszeit von 1 h und 1,5 h, so dass alle weiteren Versuche mit einer Inkubationszeit von 1 h durchgeführt wurden. Nach der Inkubation wurde das Inkubationsmedium abgenommen und mit Ethylacetat extrahiert. Die Zellen wurden abtrypsiniert, in Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) aufgenommen und zur Lyse über Nacht bei -80°C eingefroren. Danach erfolgte die Extraktion mit Folch-Reagenz. Sowohl die Extrakte des Zellkulturmediums als auch die der Zellen wurden in der HPLC mittels UV-Detektion hinsichtlich ihres Gehaltes an Quercetin untersucht. Die Extraktionsverluste wurden durch Zugabe von TMBPA als interner Standard vor der Extraktion in der Auswertung berücksichtigt. Die genaue Durchführung ist in 6.2.12.2 beschrieben. Da in V79-Zellen aktive COMT vorhanden war (s. 3.2.1.2), konnten im Medium der Zellen sowie im Zelllysate zusätzlich die Methylierungsprodukte des Quercetins detektiert werden. Wie Abbildung 3.18 zeigt, kann die COMT Quercetin an zwei Hydroxylgruppen methylieren. Beide Methylierungsprodukte wurden bei diesen Versuchen detektiert. Abgesichert wurden die Methylierungsprodukte durch einen COMT-Assay (Durchführung s. 6.2.4.2) mit Rattenlebercytosol einer männlichen Sprague-Dawley (SD) Ratte als Enzymquelle und Quercetin ($50 \mu\text{M}$) als Substrat. Die Inkubationszeit betrug 25 Min. Auch hier wurden beide Methylierungsprodukte gebildet, die in ihren Retentionszeiten denen im Zellkulturmedium bzw. in den Zellen entsprachen. Abbildung 3.39 zeigt, dass bei Inkubationen mit L(Quercetin) die detektierten Mengen an Quercetin im Medium als auch in den inkubierten V79-Zellen höher waren als bei Inkubationen ohne Liposomen. Das Verhältnis zwischen der Quercetinmenge, detektiert bei Inkubationen mit L(Quercetin), und erhaltener Menge bei Quercetininkubationen ohne Liposomen betrug im Medium 1,6 und in V79-Zellen 2,7. Außerdem wird in dieser Abbildung deutlich, dass trotz der Verpackung in Lipo-

somen nur ein Bruchteil dessen, was bei der Inkubation der Zellen an Quercetin ins Zellkulturmedium gegeben wurde, in den Zellen ankam.

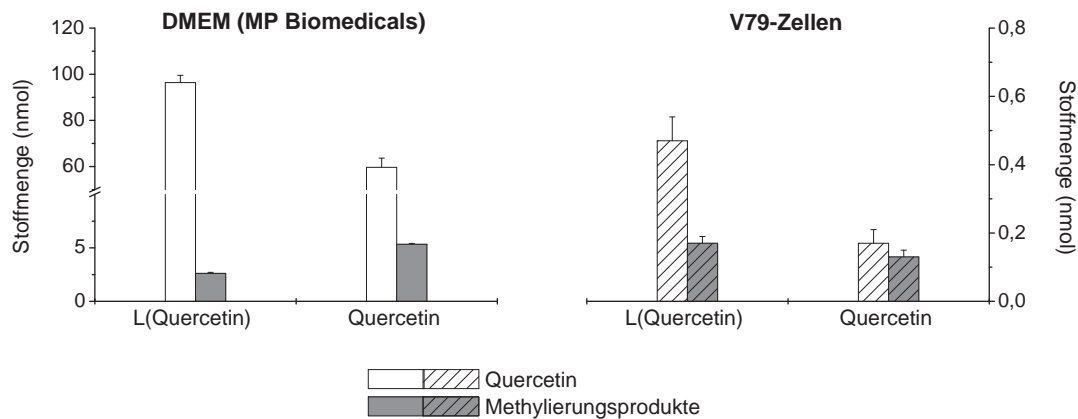


Abbildung 3.39.: Detektierte Menge an Quercetin sowie dessen Methylierungsprodukte in DME-Pulvermedium (MP Biomedicals) und in V79-Zellen (3×10^6) nach Inkubationen mit Quercetin bzw. L(Quercetin). Die Quercetinkonzentration betrug $50 \mu\text{M}$ und die Inkubationszeit 1 h. Die dargestellten Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SA}$ von drei unabhängigen Experimenten.

Bei der Betrachtung der Methylierungsprodukte zeigte sich eine andere Verteilung. Im Medium war die Menge der Methylierungsprodukte bei Quercetininkubation ohne Liposomen doppelt so hoch wie bei Inkubationen mit L(Quercetin). Berechnet man den prozentualen Anteil der Methylierungsprodukte bezogen auf den Gesamtgehalt von Quercetin und seinen Methylierungsprodukten, so liegen im Medium der Inkubationen ohne Liposomen 8% als Methylierungsprodukte vor, mit Liposomen dagegen nur 3%. In den Zellen war die detektierte Stoffmenge an Methylierungsprodukten des Quercetins, unabhängig von der Inkubationsart, ungefähr gleich groß. Deshalb war auch in V79-Zellen der prozentuale Anteil der Methylierungsprodukte bei Quercetininkubationen ohne Liposomen mit 43% deutlich größer als bei Verwendung von L(Quercetin) (26%). Dies lässt den Schluss zu, dass durch die Liposomen zwar mehr Quercetin in die Zellen transportiert wurde, dieses jedoch nicht innerhalb der Inkubationszeit von 1 h die Liposomen verlassen konnte. Dadurch stand der COMT im Cytosol weniger Quercetin zur Methylierung zur Verfügung. Bei Inkubationen mit Quercetin ohne Liposomen war der Gehalt an Quercetin in den Zellen geringer, jedoch lag alles frei vor und konnte durch die COMT methyliert werden. Deshalb wurden im

Verhältnis mehr Methylierungsprodukte des Quercetins detektiert als bei Inkubationen mit L(Quercetin).

Die beschriebenen Untersuchungen wurden in verschiedenen Zellkulturmedien durchgeführt, um die Stabilität des Quercetins in Anwesenheit von Zellen in verschiedenen Medien zu testen. Dabei zeigte sich, dass die Zusammensetzung des verwendeten Mediums einen großen Einfluss auf die Stabilität des Quercetins hatte. Bei den bisherigen Experimenten wurde DMEM (MP Biomedicals) verwendet, das als Pulvermedium gekauft und selbst angesetzt wurde. Ein weiteres DMEM, welches verwendet wurde, war ein Flüssigmedium (Sigma/Aldrich). Dieses unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung von dem DME-Pulvermedium nur in der enthaltenen Natriumbikarbonatkonzentration (s. A.3), weshalb die Ergebnisse in Abbildung 3.40 denen in Abbildung 3.39 sehr ähnlich sind.

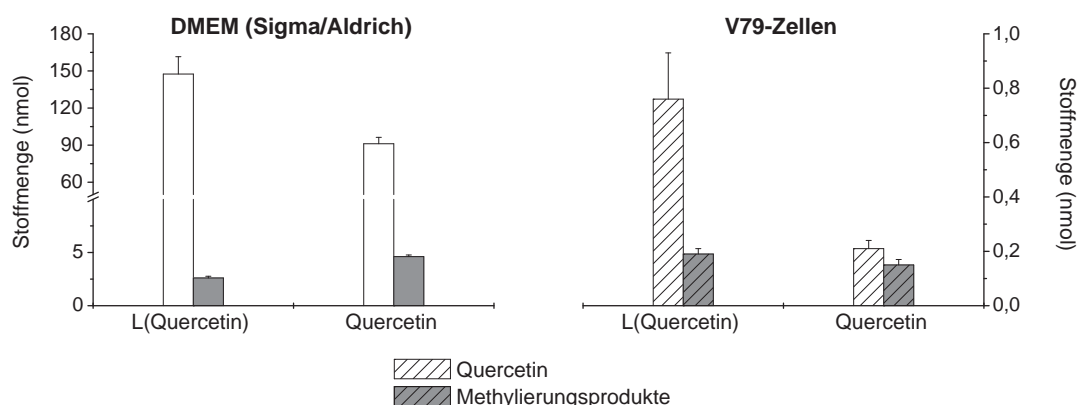


Abbildung 3.40.: Menge an Quercetin sowie dessen Methylierungsprodukte in DME-Flüssigmedium (Sigma/Aldrich) und in 3×10^6 V79-Zellen nach Inkubationen mit Quercetin bzw. L(Quercetin). Die Quercetinkonzentration betrug $50 \mu\text{M}$ und die Inkubationszeit 1 h. Die dargestellten Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SA}$ von drei unabhängigen Experimenten.

Es wurde sowohl im Medium als auch in den V79-Zellen eine höhere Quercetinmenge erreicht, wenn mit L(Quercetin) inkubiert wurde. Allerdings waren die detektierten Quercetinmengen bei der Verwendung des Flüssigmediums durchgehend etwas höher als im Pulvermedium (s. Abbildung 3.39). Auch die erhaltenen Werte für die Methylierungsprodukte waren gut vergleichbar. Während im Medium bei Inkubationen mit

L(Quercetin) nur 2% der detektierten Menge als Methylierungsprodukte des Quercetins vorlagen, waren es bei Inkubationen mit Quercetin ohne Liposomen 5%. Ebenso konnte in V79-Zellen bei Quercetininkubationen ein höherer Anteil an Methylierungsprodukten detektiert werden (42%) als bei Inkubationen mit L(Quercetin) (20%). Das dritte DMEM, das getestet wurde, war ein Pulvermedium (Sigma/Aldrich), welches, im Vergleich zu den bisher untersuchten Medien, kein Natriumpyruvat sowie anstatt Pyridoxin die Aldehydform Pyridoxal enthielt (s. A.3). Führte man die beschriebenen Versuche mit diesem Medium durch, war die Quercetinmenge, wie Tabelle 3.7 zeigt, im Medium durchschnittlich um 70% geringer. Es konnte zwar immer noch etwas mehr Quercetin im Medium bzw. in den Zellen detektiert werden, wenn mit L(Quercetin) inkubiert wurde, aber der Unterschied zu den Inkubationen mit Quercetin ohne Liposomen war nur noch sehr klein. Außerdem war die detektierte Quercetinmenge in den V79-Zellen sehr gering. Die dargestellten Werte stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen, was zeigt, dass diese Ergebnisse reproduzierbar waren.

Tabelle 3.7.: Quercetinmenge in DME-Pulvermedium (Sigma/Aldrich) ohne bzw. mit Zusatz von 0,11 g/l Natriumpyruvat und in V79-Zellen (3×10^6) nach Inkubationen mit Quercetin bzw. L(Quercetin). Die Quercetinkonzentration betrug $50 \mu\text{M}$ und die Inkubationszeit 1 h. Na, Natrium.

Inkubationsart	DME-Pulvermedium (Sigma/Aldrich)		V79-Zellen	
	– Na-Pyruvat (nmol)	+ Na-Pyruvat (nmol)	– Na-Pyruvat (nmol)	+ Na-Pyruvat (nmol)
L(Quercetin)	$26,3 \pm 1,9$	$65,2 \pm 3,0$	$0,03 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,13$
Quercetin	$17,8 \pm 1,3$	$51,2 \pm 4,2$	$0,02 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,05$

Nun wurde dem DME-Pulvermedium (Sigma/Aldrich) ohne Natriumpyruvat die in den anderen Medien enthaltene Konzentration an Natriumpyruvat (0,11 g/l) zugesetzt und die Experimente noch einmal wiederholt. Wiederum waren die detektierten Quercetinmengen in den drei unabhängigen Versuchen sehr gut reproduzierbar (Tabelle 3.7). Durch den Zusatz an Natriumpyruvat nahm die Menge an nachgewiesenem Quercetin wieder etwas zu, allerdings war sie in diesem Medium immer noch um ca. 30% geringer als beim zu anfangs verwendeten Pulvermedium (MP Biomedicals; s. Abbildung 3.39).

Aus der Literatur ist bekannt, dass bei Inkubationen von Zellen mit Polyphenolen diese mit nicht-identifizierten Bestandteilen des Mediums reagieren und dabei

H₂O₂ entsteht [Lapidot et al. (2002); Long et al. (2000)]. Dieses kann in Anwesenheit von Metallionen (z.B. Fe²⁺, Cu⁺) zu den sehr reaktiven Hydroxylradikalen reagieren (Fenton-Reaktion) und so z.B. DNA-Schäden vortäuschen, die nicht durch Substanzinkubation erhalten wurden. Durch Zugabe des Enzyms Katalase kann diese Artefaktbildung reduziert werden [Kern et al. (2007); Lapidot et al. (2002)]. Um zu sehen, ob diese Reaktion der Grund für den unterschiedlichen Quercetiningehalt in den verschiedenen eingesetzten Medien ist, wurden den Medien Katalase zugesetzt. Ein Zusatz des Enzyms Katalase (100 U/ml Medium), welches in der Lage ist, H₂O₂ zu H₂O und O₂ umzusetzen, zeigte jedoch keine positiven Effekte auf die Stabilität von Quercetin in DME-Flüssigmedium (Sigma/Aldrich) bzw. DME-Pulvermedium (Sigma/Aldrich) und wurde deshalb nicht mehr weiter verfolgt. Die Reaktion des Quercetins mit Mediumbestandteilen unter Bildung von H₂O₂ ist folglich nicht die Ursache für die stark unterschiedlichen Quercetinkonzentrationen beim Einsatz der verschiedenen DME-Medien. Die durch Quercetin induzierten DNA-Strangbrüche in Abbildung 3.32 könnten auch eine Folge dieser H₂O₂-Bildung im Inkubationsmedium sein, jedoch wurden auch Strangbrüche mit L(Quercetin) gemessen (s. 3.3.4.3). Durch die Liposomen steigt die Stabilität des Quercetins im Medium, was die H₂O₂-Bildung mindestens reduzieren würde. Aufgrund dessen werden die durch Quercetin induzierten DNA-Strangbrüche in Abbildung 3.32 nicht als Artefakte angesehen.

Diese Versuche machen deutlich, dass die Wahl des Mediums durchaus das Ergebnis beeinflussen kann. Da die Ergebnisse mit dem DME-Pulvermedium (Sigma/Aldrich) und dem DME-Pulvermedium (Sigma/Aldrich) + Natriumpyruvat nicht zufriedenstellend waren, wurden für alle Versuche mit DMEM das Pulvermedium (MP Biomedicals) oder das Flüssigmedium (Sigma/Aldrich) verwendet.

3.3.4.3. Beeinflussung der Induktion von DNA-Strangbrüchen in kultivierten V79-Zellen durch Liposomen

Da durch den Einsatz von Liposomen der Quercetiningehalt in den Zellen deutlich gesteigert werden konnte, wurde nun untersucht, ob dies zu einer höheren Induktion von DNA-Strangbrüchen führt. Dazu wurden V79-Zellen (1×10^5) für 1,5 h mit L(Quercetin) inkubiert (25 bzw. 50 µM) oder mit Quercetin ohne Liposomen (50 µM). Als Kontrolle wurden V79-Zellen mit Liposomen inkubiert, die keine Substanz enthielten, um zusätzliche Effekte auf die DNA durch die Liposomen ausschließen zu können. t-BuOOH (50 µM) diente als Positivkontrolle. Zur Messung der DNA-Strangbrüche wurde Methode A (s. 6.2.10.1) eingesetzt.

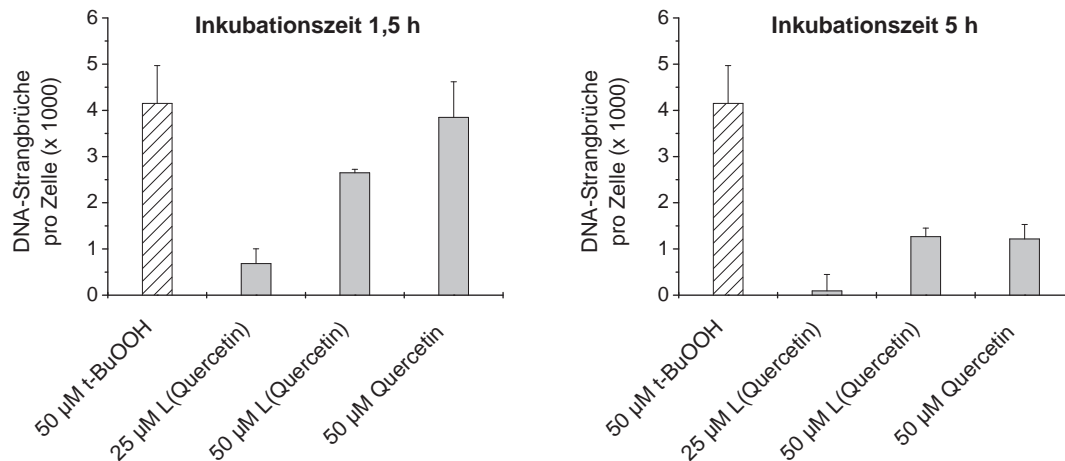


Abbildung 3.41.: DNA-Strangbrüche in V79-Zellen nach 1,5- (links) bzw. 5-stündiger Inkubation (rechts) mit L(Quercetin) und Quercetin ohne Liposomen. Die Quercetinkonzentration betrug 50 µM, in Liposomen zusätzlich 25 µM. Die Positivkontrolle t-BuOOH wurde in einer Konzentration von 50 µM eingesetzt. MW \pm SA einer Dreifachbestimmung eines Versuches sind abgebildet.

Wie Abbildung 3.41 (links) zeigt, konnten nach einer Inkubationszeit von 1,5 h bei L(Quercetin) konzentrationsabhängig DNA-Strangbrüche induziert werden. Jedoch wurden bei Inkubationen mit Quercetin ohne Liposomen (50 µM) mehr Strangbrüche gemessen als in V79-Zellen, die mit L(Quercetin) (50 µM) inkubiert wurden. Bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 5 h (s. Abbildung 3.41, rechts) konnte eine konzentrationsabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen bestätigt werden. Außerdem sind nun die nachgewiesenen DNA-Strangbrüche bei Inkubationen mit Quercetin (50 µM) bzw. mit L(Quercetin) (50 µM) gleich hoch, verglichen mit den Strangbruchraten bei einer Inkubationszeit von 1,5 h jedoch deutlich geringer.

Trotz der durch den Einsatz von Liposomen erzielten höheren Gehalte des Catechols Quercetin in V79-Zellen (s. 3.3.4.2) konnte die Induktion der DNA-Strangbrüche in diesen Zellen nicht erhöht werden. Wie bereits in 3.3.4.2 diskutiert, benötigt das Quercetin vermutlich Zeit, um wieder aus den Liposomen heraus zu gelangen und spricht für die Aufnahme der Liposomen mittels Endocytose (s. auch 1.1.5). Hier werden die Liposomen von der Plasmamembran umhüllt und als Vesikel in das Zellinnere befördert. Dort verschmelzen sie mit den Lysosomen, welche die zum Abbau der Endosomen er-

forderlichen Enzyme enthalten. Das Quercetin ist dadurch nicht sofort nach Eintritt in die Zelle verfügbar. Durch die Verlängerung der Inkubationszeit bei der Untersuchung der Induktion von DNA-Schäden wurden zwar sowohl bei Inkubationen mit L(Quercetin) als auch mit Quercetin ohne Liposomen gleich hohe DNA-Strangbrüche erhalten, dennoch waren diese insgesamt deutlich geringer als bei einer Inkubationszeit von 1 h. Dies ist wahrscheinlich auf bereits einsetzende Reparaturprozesse bzw. auch auf die Instabilität des Quercetins (s. 3.2.1.3) zurückzuführen. Noch längere Inkubationszeiten würden somit auch nicht zu dem gewünschten Ergebnis führen, mehr DNA-Strangbrüche durch den Einbau von Catecholen in Liposomen zu erhalten. Aus diesem Grund stellt die Verpackung von Catecholen in Liposomen auch keine geeignete Methode dar, um die Anzahl an DNA-Schäden, induziert durch CEs, in kultivierten Zellen zu erhöhen.

Es wurden noch zwei weitere Möglichkeiten ausgetestet, um mehr DNA-Schäden zu erzeugen. Zum einen wurde der COMT-Hemmstoff Ro 41-0960 eingesetzt, um die Methylierung der CEs in Zellen zu unterdrücken. In verschiedenen Untersuchungen führte der Einsatz des COMT-Hemmstoffes Ro 41-0960 durch die Hemmung der CE-Methylierung zur Erhöhung von DNA-Schäden [van Duursen et al. (2004); Lavigne et al. (2001); Zahid et al. (2007)]. Dafür wurden MCF-7-Zellen verwendet, da diese Zellen nur COMT-Aktivität besaßen und keine UGT- bzw. HSD-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Ab einer COMT-Hemmstoffkonzentration von 2 μM wurde keine messbare Methylierung von 2-HO-E2 in MCF-7-Zellen detektiert (Durchführung s. 6.2.14). Eine Cytotoxizität des COMT-Inhibitors wurde zuvor durch den Cytotoxizitätstest mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 100 μM ausgeschlossen (s. 6.2.13). Eine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate konnte jedoch durch den Einsatz von Ro 41-0960 in MCF-7-Zellen nicht erzielt werden (Anleitung s. 6.2.10.1).

Zum anderen wurde versucht, die CEs mittels eines Induktors der CYPs aus E2 in Zellen zu erzeugen und dadurch deren Gehalt in diesen Zellen zu erhöhen. Dazu wurden MCF-7- bzw. HepG2-Zellen zuerst mit dem Induktor Aroclor 1254 (s. 1.1.1.1) und danach mit E2 in einem Konzentrationsbereich von 5 - 50 μM inkubiert. Anschließend wurde die AU (Methode A) durchgeführt (s. 6.2.10.1). Auch hier wurde die Cytotoxizität von Aroclor 1254 unter den verwendeten Bedingungen in beiden Zelllinien mittels MTT-Assay (6.2.13) ausgeschlossen. Trotz der vorhandenen CYP-Induktion (Pfeiffer, unveröffentlichte Daten) konnten keine DNA-Strangbrüche induziert werden. Wie

Dubois et al. (1996) in seinen Untersuchungen zeigte, kann die Induktion der CYPs in verschiedenen Zelllinien sehr unterschiedlich sein. In den untersuchten Zelllinien reichte die Induktion der CYPs durch Aroclor 1254 nicht aus, um genügend CEs zur Induktion von DNA-Strangbrüchen aus E2 zu bilden. Daraus wurde geschlossen, dass auch diese Methode sich nicht zur Erhöhung der Induktion von DNA-Strangbrüchen durch CEs eignet.

Die CEs induzierten somit in kultivierten Zelllinien (V79-, MCF-7- sowie HepG2-Zellen), abhängig von ihrem Metabolismus in den jeweiligen Zellen, DNA-Strangbrüche. In Kalbsthymus-DNA, unabhängig von zellulären Einflüssen, war die Zunahme an einzelsträngiger DNA bei allen vier eingesetzten CEs ungefähr gleich. Dies deutet darauf hin, dass in den untersuchten Zelllinien neben den CEs und ihrem Metabolismus auch noch andere zelluläre Einflüsse bei den CE-induzierten DNA-Strangbrüchen eine Rolle spielten. Alle getesteten Methoden zur Erhöhung der DNA-Strangbruchrate blieben ohne Erfolg.

4. Diskussion

4.1. Beeinflussung der E2-Glucuronidierung durch exogene und endogene Substanzen

E2 ist in der Lage, seine Glucuronidierung an Position 3, katalysiert durch UGT1A1, selbst zu aktivieren. Dies nennt man homotrope Aktivierung [Alkharfy und Frye (2002); Fisher et al. (2000)] und ist auf die Hill-Kinetik zurückzuführen, die der E2-3-Glucuronidierung zugrunde liegt. Aber nicht nur E2 selbst, sondern auch andere Substanzen können die E2-3-Glucuronidierung modulieren. Eine heterotrope Aktivierung der E2-Glucuronidierung an Position 3 wurde bereits für das synthetische Estrogen 17 α -Ethinylestradiol mit HLM als UGT-Quelle nachgewiesen [Williams et al. (2002)]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Isoflavon Daidzein, nicht aber Genistein, in der Lage war, die E2-3-Glucuronidierung mit HLM zu steigern. Der Mechanismus der homotropen bzw. heterotropen Aktivierung der E2-3-Glucuronidierung ist nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre, dass UGT1A1 in einer multimeren Form vorliegt. Die Bindung von E2 bzw. des Daidzeins an eine Untereinheit könnte somit die Affinität der anderen Untereinheit(en) für weitere Substratmoleküle steigern. Für ein Vorliegen von UGT1A1 als multimeres Enzym gibt es bereits experimentelle Beweise [Meech und Mackenzie (1997); Peters et al. (1984)]. Andere Erklärungen für die kooperativen Fähigkeiten der UGT1A1-Isoform sind, dass allosterische Effektorstellen in diesem Enzym existieren oder, dass zwei Substratmoleküle das aktive Zentrum von UGT1A1 besetzen [Williams et al. (2002)].

Die beiden Isoflavone Daidzein und Genistein unterscheiden sich nur in der Hydroxylgruppe an Position 5 (s. Abbildung 1.10), weshalb die Vermutung nahe liegt, dass diese Hydroxylgruppe den aktivierenden Effekt verhindert. Dafür sprechen auch Ergebnisse von Pfeiffer et al. (2005) bzw. Satoh et al. (2004), bei denen Substanzen ohne Hydroxylgruppe an Position 5 wie z.B. die Daidzeinmetaboliten Glycitein und 6-HO-Daidzein oder ein synthetisches Isoflavon, das Ipriflavon, die Bildung des E2-3-G mit HLM stimulierten. Dagegen zeigten die Flavonoide Chrysin, Quercetin oder

Naringenin, die an Position 5 eine Hydroxylgruppe haben, keine Aktivierung der E2-3-Glucuronidierung mit HLM [Williams et al. (2002)].

Es gibt Hinweise dafür, dass z.B. die unspezifische Bindung des Substrates oder seiner Metaboliten an Komponenten der Inkubationsmatrix bzw. die Verwendung von Multienzymsystemen (wie z.B. HLM) eine Sigmoidität vortäuschen können [Houston und Kenworthy (2000); Hutzler und Tracy (2002)]. Die Steigerung der E2-3-Glucuronidierung durch Daidzein konnte jedoch auch mit einer humanen rekombinanten UGT1A1-Isoform nachgewiesen werden. Für die Glucuronidierung an Position 17 des E2 wurde dagegen sowohl mit HLM als auch mit dem humanen rekombinanten UGT1A1-Isoenzym eine Hemmung festgestellt [Pfeiffer et al. (2005)]. Das Daidzein aktivierte somit spezifisch die UGT1A1-Isoform und die E2-3-Glucuronidierung. Außerdem wurde bei Untersuchungen von Soars et al. (2003), die den Einfluss verschiedener Inkubationsbedingungen auf das kinetische Profil der E2-3-Glucuronidierung mit HLM bzw. mit rekombinanter UGT1A1-Isoform bestimmten, unter allen verwendeten Inkubationsbedingungen eine Hill-Kinetik für die E2-3-Glucuronidierung nachgewiesen. Daraus folgt, dass, zumindest *in vitro*, die heterotrope Aktivierung der E2-3-Glucuronidierung keinen Artefakt, sondern einen Effekt des Daidzeins darstellte.

Heterotrope Aktivierungen sind für Substrate verschiedener CYP-Isoformen (z.B. CYP3A4) sehr gut untersucht [Hutzler und Tracy (2002)]. Jedoch gibt es auch für homotrope bzw. heterotrope Aktivierungen von UGTs immer mehr Beispiele [Fisher et al. (2000); Wong et al. (2007)]. Die meisten dieser Aktivierungen wurden in mikrosomalen Systemen nachgewiesen [Fisher et al. (2000); Hutzler und Tracy (2002); Tang et al. (1999b)] und nur sehr wenige *in vivo* [Tang et al. (1999a); Wong et al. (2007)]. Falls die heterotrope Aktivierung der E2-3-Glucuronidierung durch Daidzein *in vivo* stattfindet, könnte dadurch die Exkretion von E2 beschleunigt werden, was niedrigere E2-Konzentrationen im Blut oder in Geweben zur Folge hätte. In einer Studie von Lu et al. (1996) konnte eine 30 - 80%ige Senkung des E2-Serumspiegels bei Frauen an verschiedenen Tagen des Menstruationszyklus nachgewiesen werden, denen einen Monat lang täglich dreimal zu den Mahlzeiten Sojamilch (mit je 100 mg Daidzein bzw. Genistein) verabreicht wurde. Allerdings können aufgrund dieser Studie keine Rückschlüsse auf den Mechanismus gezogen werden, welcher der geringeren E2-Konzentration im Plasma zugrunde liegt.

Da Genistein *in vitro* einen hemmenden Einfluss auf die E2-3-Glucuronidierung hat, die beiden Isoflavone in der Nahrung, wie z.B. in Sojaprodukten, jedoch oft zusammen vorkommen, könnte es sein, dass das Genistein *in vivo* den aktivierenden Effekt des

Daidzeins antagonisiert. Die beiden Isoflavone werden aber *in vivo* auch metabolisiert, und es sind, wie bereits beschrieben, auch einige Daidzeinmetaboliten *in vitro* in der Lage, die E2-3-Glucuronidierung zu aktivieren [Pfeiffer et al. (2005)]. Humanstudien [Kulling et al. (2001); Zhang et al. (2003)] sowie Studien an Ratten [Bayer et al. (2001)] zeigten, dass sowohl die Isoflavone als auch oxidative Metaboliten, Isoflavonglucuronide und -sulfate, nach Aufnahme von Soja bzw. der Isoflavone, im Urin detektiert wurden. Allerdings muss auch darauf hingewiesen werden, dass in den Fäzes der Ratten der unkonjugierte Isoflavonanteil sehr hoch war, was, zumindest in der Ratte, auf eine geringe Resorption der Isoflavone schließen lässt.

17 α -Ethinylestradiol und das Isoflavon Daidzein sind Beispiele für exogene Substanzen, die, im Falle des E2, die Glucuronidierung eines endogenen Stoffes mit HLM beeinflussen können. Es ist jedoch auch denkbar, dass andere endogene Stoffe in die E2-Glucuronidierung mit HLM eingreifen. Die CEs sowie 4-MeO-E2 hemmten die Glucuronidierung des E2 an Position 3, wobei der inhibitorische Effekt bei den CEs größer war als bei 4-MeO-E2. Da nach Lepine et al. (2004) die 2-HO-CEs in der Leber bevorzugt von UGT1A1 glucuronidiert werden, war zu erwarten, dass die 2-HO-CEs mit dem E2 in Konkurrenz um die Bindungsstelle von UGT1A1 treten und dadurch kompetitiv die E2-Glucuronidierung hemmen. Die Untersuchungen von Lepine et al. (2004) zeigten auch, dass die Glucuronidierung der 4-HO-CEs in der Leber vorwiegend durch UGT2B7 katalysiert wird. 4-MeO-E2 wurde hingegen hauptsächlich durch das UGT1A8-Isoenzym glucuronidiert, welches nur im Gastrointestinaltrakt vorkommt [Tukey und Strassburg (2001); Uchaipichat et al. (2004)]. Aufgrund dessen ist die Hemmwirkung der 4-HO-CEs bzw. des 4-MeO-E2 wahrscheinlich nicht auf eine kompetitive Hemmung zurückzuführen. Da UGT1A1 als multimeres Enzym vorliegen soll [Houston und Kenworthy (2000); Meech und Mackenzie (1997); Peters und Jansen (1986); Williams et al. (2002)], wäre jedoch eine Bindung sowohl der 4-HO-CEs als auch des 4-MeO-E2 an eine zweite Bindungsstelle des UGT1A1-Isoenzym, welche inhibitorisch auf die E2-3-Glucuronidierung wirkt, denkbar [Hutzler und Tracy (2002); Parkin (2003)]. Die CEs können allerdings sehr gut metabolisiert werden, weshalb davon auszugehen ist, dass normalerweise ihre intrazelluläre Konzentration gering ist und somit die Hemmung der E2-3-Glucuronidierung keine große Rolle spielt.

Die Hemmung der 2-MeO-E2-Glucuronidierung mit HLM durch Daidzein könnte *in vivo* von Bedeutung sein, da 2-MeO-E2 als protektiver E2-Metabolit gilt, der u.a. die Proliferation von Brustkrebszellen hemmt [Dawling et al. (2001); Zhu und Conney (1998a)]. Eine verminderte Exkretion würde die intrazelluläre Konzentration dieses

Metaboliten erhöhen. Dies könnte, neben der Aktivierung der E2-3-Glucuronidierung, ein weiterer positiver Aspekt von Daidzein darstellen.

4.2. Phase II-Metabolismus der CEs und seine Bedeutung für ihre Toxizität

Die CEs stellen reaktive Metaboliten des E2 dar, weshalb ihnen eine Rolle bei der E2-vermittelten Entstehung hormonabhängiger Tumoren zugesprochen wird [Cavalieri et al. (1997); Roy et al. (2007)]. Durch die Oxidation der CEs entstehen ihre entsprechenden 2, 3- bzw. 3, 4-Chinone, die DNA-Addukte bilden können [Cavalieri et al. (2006); Li et al. (2004); Zahid et al. (2006)]. Zusätzlich können durch Redoxcycling-Prozesse zwischen den CEs und ihren Chinonen Semichinon-Intermediate gebildet werden, die zur Entstehung von ROS führen und ebenfalls die DNA schädigen können [Roy et al. (2007); Yager und Liehr (1996)]. Die CEs werden durch Methylierung, Glucuronidierung oder Sulfatierung inaktiviert [Adjei und Weinshilboum (2002); Guillemette et al. (2004); Zhu und Conney (1998a)]. Da aber Untersuchungen zum CE-Metabolismus sowie zu ihrer Genotoxizität oft nur mit einem oder zwei verschiedenen CEs durchgeführt wurden [Chen et al. (2005b); Hurh et al. (2004); Lin et al. (2003)], wurde in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen dem Metabolismus aller vier CEs und ihrem Potential, DNA-Strangbrüche zu induzieren, analysiert.

Es wurde gezeigt, dass die vier CEs in drei verschiedenen Zelllinien (V79-, MCF-7- und HepG2-Zellen) DNA-Strangbrüche induzierten. Die DNA-Strangbrüche können z.B. eine Folge der ROS-Entstehung beim Redoxcycling [Liehr (1997); Roy und Liehr (1999)] bzw. von alkalilabilen Stellen sein [Rueff et al. (1996)]. Dabei scheint ein Zusammenhang vorzuliegen zwischen der Struktur der CEs sowie der CE-Metabolisierung in den Zellen (bzw. der intrazellulären CE-Konzentration) und dem Ausmaß an DNA-Strangbrüchen. In V79-Zellen, deren Zelllysate die CEs am geringsten metabolisierte, konnten die meisten CE-induzierten DNA-Strangbrüche detektiert werden. Dies wird noch deutlicher, wenn man bedenkt, dass die Positivkontrolle t-BuOOH nur sehr wenige Strangbrüche in diesen Zellen induzierte. V79-Zellen hatten somit, im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien, eine geringere Sensitivität. Es gibt verschiedene Angaben dazu, welche Enzyme in diesen Zellen aktiv sind bzw. nicht exprimiert werden. So sollen V79-Zellen keine CYPs exprimieren [Doehmer (2003)], und mit V79-Zelllysaten konnte auch keine UGT-Aktivität nachgewiesen werden [Glatt et al. (1990)]. In dieser Arbeit konnte mit Zelllysaten aus V79-Zellen sowohl die Methylierung der CEs als auch

die Oxidation der E2-CEs in ihre entsprechenden E1-CEs und umgekehrt detektiert werden, wobei die Oxidation zu den E1-CEs überwog. Deshalb ist bei den verwendeten V79-Zellen davon auszugehen, dass sie aktive COMT bzw. HSDs besitzen. Über die COMT- bzw. die HSD-Aktivität in V79-Zellen war bisher nichts bekannt. Die Aktivität dieser Enzyme in V79-Zellen könnte für toxikologische Untersuchungen von Bedeutung sein, da oft V79-Zellen, die stabil mit jeweils einem bestimmten CYP-Isoenzym transfiziert wurden, eingesetzt werden. Diese dienen zur Identifizierung reaktiver Metaboliten von Arzneimitteln [Doehmer (2003)]. Dabei könnten jedoch Catechole entstehen, die durch aktive COMT in V79-Zellen wieder inaktiviert werden. Ihr toxisches Potential bliebe dadurch unerkannt.

In MCF-7- bzw. HepG2-Zellen war bei Inkubationen mit den CEs die Anzahl an detektierten DNA-Strangbrüchen, im Vergleich zu V79-Zellen, deutlich niedriger. Dabei waren die 2-HO-CEs nahezu inaktiv, während vor allem 4-HO-E1 in diesen Zelllinien Strangbrüche induzierte. Dies kann am besten erklärt werden, wenn der CE-Metabolismus in Betracht gezogen wird. In beiden Zelllinien wurden Methylierungsprodukte der CEs detektiert. Während beschrieben ist, dass MCF-7-Zellen COMT exprimieren [Lavigne et al. (2001); Lehmann und Wagner (2008); Jiang et al. (2003)], gibt es über die COMT-Aktivität in HepG2-Zellen keine Angaben. Für 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 wurden zwei Methylierungsprodukte (2-MeO-E2/-E1 bzw. 2-HO-3-O-Me-E2/-E1) detektiert. Dagegen konnte bei Inkubationen mit 4-HO-E2 bzw. 4-HO-E1 nur jeweils ein Methylierungsprodukt, 4-MeO-E2 bzw. 4-MeO-E1, identifiziert werden. Dies bestätigen auch Untersuchungen der Methylierung von 2-HO-E2 bzw. 4-HO-E2 mit rekombinanter COMT, bei denen ebenfalls keine Methylierungsprodukte an Position 3 von 4-HO-E2 bzw. 4-HO-E1 detektiert werden konnten [Dawling et al. (2004, 2001)]. Außerdem wurden in dieser Arbeit für die Methylierung der 2-HO-CEs höhere katalytische Aktivitäten bzw. mehr Methylierungsprodukte nachgewiesen als für die Methylierung der 4-HO-CEs. Auch dies wurde schon mehrfach beschrieben [Hirose et al. (2007); Lavigne et al. (2001)]. Somit wurden bei Inkubationen mit 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1, zwei gute Substrate der COMT, weniger DNA-Strangbrüche detektiert als beim Einsatz von 4-HO-E2 und 4-HO-E1, die nicht so gut methyliert wurden. Durch die Methylierung wird zum einen die intrazelluläre Konzentration der beiden CEs reduziert, zum anderen mit 2-MeO-E2 ein Metabolit mit protektiven Eigenschaften gebildet [Dawling et al. (2001); Zhu und Conney (1998a)]. Deshalb stellt die Methylierung in diesen beiden Zelllinien einen effektiven Inaktivierungsmechanismus für 2-HO-E2 sowie 2-HO-E1 dar. Die Methylierung führt zur Bildung lipophi-

lerer Substanzen mit langen Halbwertszeiten [Zhu und Conney (1998a)]. Eine Folge davon ist, dass vor allem das 2-MeO-E2 lange im Körper bleibt und seine biologischen Wirkungen entfalten kann. Die Wichtigkeit der COMT in der Vermeidung bzw. Verringerung genotoxischer Effekte der CEs wurde bereits von Hirose et al. (2007) in Embryozellen des Syrischen Hamsters gezeigt. Außerdem konnte in MCF-7-Zellen, welche mit E2 behandelt wurden, durch die Hemmung der COMT eine gesteigerte Anzahl an oxidativen DNA-Schäden detektiert werden [Lavigne et al. (2001)]. Eine Vorbehandlung mit dem CYP-Induktor 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-Dioxin (TCDD) führte hierbei zur vermehrten CE-Bildung, vor allem der 2-HO-CEs. Auch diese Untersuchungen zeigen, dass der CE-Metabolismus in Bezug auf die Genotoxizität der CEs *in vitro* eine Rolle spielt. In der Literatur werden die schnelle Inaktivierung von 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 sowie das durch die Methylierung gebildete 2-MeO-E2, das einen potenten Inhibitor der Tumorzellproliferation und der Angiogenese darstellt [Zhu und Conney (1998a)], als Gründe dafür angeführt, dass *in vivo* für diese CEs keine kanzerogene Wirkung nachgewiesen werden konnte [Cavalieri et al. (2000)]. In epidemiologischen Studien ist der Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus des COMT-Gens und der Entstehung hormonabhängiger Tumoren noch nicht ganz klar. Während z.B. bei Studien von Lavigne et al. (1997) bzw. Huang et al. (1999) das Brustkrebsrisiko mit einer niedrigen COMT-Aktivität infolge eines Polymorphismus korrelierte, konnte Hamajima et al. (2001) keinen Zusammenhang feststellen. Die UGT-Aktivität in MCF-7-Zellen war sehr gering. Dies zeigten auch Untersuchungen von Lehmann und Wagner (2008). Hier wurde der mRNA-Gehalt verschiedener UGT-Isoenzyme in MCF-7-Zellen untersucht. Die mRNA-Gehalte aller analysierten UGT-Isoenzyme lagen jedoch unterhalb der Detektionsgrenze. Außerdem besaßen die in dieser Arbeit verwendeten MCF-7-Zellen keine aktiven HSDs, was durch Untersuchungen von Jansson et al. (2006) bestätigt wird, in denen die mRNA-Expression von HSD Typ1 bzw. 2 in MCF-7-Zellen ebenfalls sehr gering war.

In HepG2-Zellen war die Metabolisierungssituation der CEs am komplexesten. Neben der beschriebenen Methylierung wurden die CEs mit Zelllysat dieser Zellen zusätzlich glucuronidiert. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass HepG2-Zellen ein größeres Spektrum an fremdstoffmetabolisierenden Enzymen besitzen als beispielsweise Fibroblasten [Rueff et al. (1996)]. Darunter sind auch viele Phase II-Enzyme, wie z.B. die UGTs [Westerink und Schoonen (2007)]. Für 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1, welche sehr gute Substrate der COMT darstellten, spielte die Glucuronidierung mit HepG2-Zelllysat keine Rolle. Dagegen wurden die 4-HO-CEs fast ausschließlich glu-

curonidiert und kaum methyliert. Dass die CEs und vor allem 4-HO-E1 sehr effektiv glucuronidiert werden, wurde auch bei Untersuchungen mit HLM deutlich. Hier hatten die CEs im Vergleich zu E2 deutlich höhere CL_{int} -Werte. Sie waren zwischen 6x und 44x höher, im Falle des 4-HO-E1, als die CL_{int} der E2-3-Glucuronidierung. Es ist davon auszugehen, dass die Glucuronide auch bei Inkubationen der CEs mit HepG2-Zellen entstehen und, aufgrund ihrer Polarität, aus der Zelle ausgeschleust werden, auch wenn der Nachweis im Inkubationsmedium dieser Zellen nicht gelang. Ein Hinweis für die stattfindende Glucuronidierung in HepG2-Zellen ist der Anstieg der Verhältnisse zwischen den zwei Methylierungsprodukten 2-MeO-E2/2-HO-3-O-Me-E2 bzw. 2-MeO-E1/2-HO-3-O-Me-E1 im Medium dieser Zellen, d.h., dass mit der Zeit bei der Verwendung von HepG2-Zellen immer mehr 2-MeO-E2 und 2-MeO-E1 vorhanden waren, aber weniger 2-HO-3-O-Me-E2 bzw. 2-HO-3-O-Me-E1. Im Medium der MCF-7-Zellen blieben hingegen die Verhältnisse über die Zeit sehr konstant. Bei Versuchen mit HLM konnte festgestellt werden, dass 2-HO-3-O-Me-E2 und auch 2-HO-3-O-Me-E1 besser glucuronidiert wurden als 2-MeO-E2 bzw. 2-MeO-E1. Wäre dies auch in HepG2-Zellen der Fall, könnte das zu geringeren Anteilen von 2-HO-3-O-Me-E2 sowie 2-HO-3-O-Me-E1 im Medium geführt haben und wäre ein Hinweis für die stattfindende Glucuronidierung sowie für die nachfolgende Ausschleusung aus den Zellen.

Da die als kanzerogen geltenden 4-HO-CEs schlechte Substrate für die COMT darstellten, ist vor allem für diese CEs eine Inaktivierung durch die Glucuronidierung sehr wichtig. Die kanzerogene Wirkung der 2-HO-CEs blieb *in vivo* oft aus, obwohl sie *in vitro* auch genotoxisch sind [Liehr et al. (1986); Liehr (1997, 1994); Zhu (2002)]. Als Ursache für die kanzerogene Wirkung der 4-HO-CEs werden u.a. die aus ihnen durch Oxidation gebildeten E1- bzw. E2-3,4-Chinone diskutiert. Da sie instabile depurinierende DNA-Addukte bilden [Belous et al. (2007); Liehr (1990); Mueck und Seeger (2007); Singh et al. (2005)]. Im Gegensatz dazu führen die 2,3-Chinone der 2-HO-CEs vorwiegend zu stabilen DNA-Addukten, die bis zu ihrer Reparatur in der DNA bleiben [Cavalieri und Rogan (2006); Roy und Liehr (1999); Roy et al. (2007)]. Eine mangelnde Inaktivierung der 4-HO-CEs wäre somit förderlich für die E2-vermittelte Tumorentstehung.

Die Glucuronidierung könnte in HepG2-Zellen zu einer Verminderung der intrazellulären CE-Konzentration geführt haben, mit der Folge, dass nur bei 4-HO-E1 in hohen Konzentrationen DNA-Strangbrüche detektiert werden konnten. Dies spricht für eine unvollständige Inaktivierung dieses CEs. Da die UGTs auf der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind, die COMT jedoch im Cy-

tosol, könnte es sein, dass die CEs, die aus dem Inkubationsmedium in die Zellen gelangen, vorrangig methyliert werden. 4-HO-E1 wird nicht sehr gut methyliert und könnte deshalb die meisten Strangbrüche induziert haben. Auf die Wichtigkeit der Glucuronidierung von Estrogenen, besonders bei der Inaktivierung der 4-HO-CEs, nicht nur in der Leber, sondern auch in estrogensensitivem Gewebe, wie z.B. dem Endometrium, weisen ebenso Lepine et al. (2004) mit ihren Experimenten hin. Nach Lepine et al. (2004) wird die Glucuronidierung der 4-HO-CEs hauptsächlich durch UGT2B7 katalysiert. Die Expression dieses Enzyms ist in invasiven Brusttumoren im Vergleich zu humanem Brustepithel stark vermindert [Gestl et al. (2002)]. Dies zeigt, dass auch im Brustgewebe die Glucuronidierung als Inaktivierungsweg für die CEs von großer Bedeutung ist. Polymorphismen sind auch für verschiedene UGTs bekannt [Mackenzie et al. (2005b); Thibaudeau et al. (2006)]. Epidemiologische Beweise für den Zusammenhang zwischen UGT-Polymorphismen und dem Risiko der Entstehung hormonabhängiger Tumoren sind, wie bei der COMT, indifferent [Guillemette et al. (2004)].

Eine weitere Enzymfamilie, die zur Inaktivierung der CEs in HepG2-Zellen und, wie bereits beschrieben, in V79-Zelllysat beiträgt, sind die HSDs. Über die HSD-Expression bzw. HSD-Aktivität in HepG2-Zellen gibt es keine Angaben. In diesen Zellen konnte nur die Oxidation der E2-CEs in ihre entsprechenden E1-CEs und nicht die Reduktion der E1-CEs nachgewiesen werden. Vor allem das 4-HO-E2, das schlechter glucuronidiert wurde als 4-HO-E1, nutzte den Weg über die Oxidation zum 4-HO-E1 und dessen Glucuronidierung zur Inaktivierung. In der Literatur gibt es bezüglich HSDs nur Untersuchungen über die Oxidation von E2 zu E1 und umgekehrt. Dabei stellen die HSDs ein wichtiger regulatorischer Mechanismus für die E2-Wirkung dar, da E1 eine geringere hormonelle Wirkung hat als E2 [Zhu und Conney (1998a)]. In Bezug auf die Inaktivierung der CEs scheint dies auch der Fall zu sein. Ein Modell des Estrogenmetabolismus in den drei untersuchten Zelllinien zeigt Abbildung 4.1.

Die drei verwendeten Zelllinien könnten sich jedoch auch in der Aktivität anderer, an der Inaktivierung der CEs beteiligter Enzyme, unterscheiden. Z.B. werden die gebildeten Chinone durch Konjugation mit GSH, katalysiert durch GSTs, inaktiviert [Dawling et al. (2004)]. Über die Aktivität der GSTs in den verwendeten Zelllinien sowie den GSH-Spiegel, die Aktivität anderer an der Inaktivierung von ROS beteiligter Enzyme (z.B. Katalase, Superoxiddismutase) oder die Aktivität von DNA-Reparaturenzymen ist nicht viel bekannt.

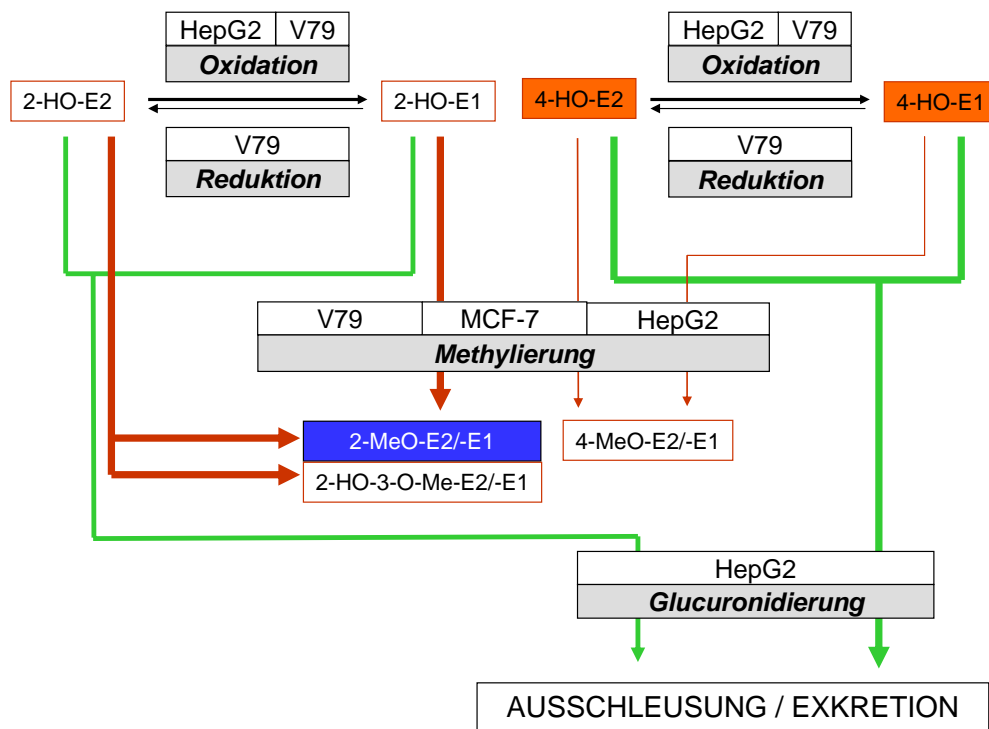


Abbildung 4.1.: CE-Metabolismus in V79-, MCF-7- und HepG2-Zellen.

Bei Untersuchungen von Aherne und O'Brien (2000a) wurde gezeigt, dass V79-Zellen, im Vergleich zu HepG2-Zellen, niedrigere Katalaseaktivitäten und hinsichtlich DNA-Einzelstrangbrüchen eine geringere Reparaturrate besitzen. Dagegen sind bei Experimenten von Glatt et al. (1990) die mit HepG2-Zelllysatz bzw. V79-Zelllysatz gemessenen Katalaseaktivitäten gleich hoch. Zusätzlich besaßen die V79-Zellen zehnfach höhere GST-Aktivitäten. Dies zeigt, dass Enzymaktivitäten in Kultur sehr verschieden sein können und nicht ohne Weiteres auf die verwendeten Zelllinien übertragbar sind. In V79-Zellen war die Strangbruchrate bei den E2-CEs höher als bei den E1-CEs, obwohl auch mit Lysatz dieser Zellen 2-HO-E2 und 2-HO-E1 besser methyliert wurden als 4-HO-E2 bzw. 4-HO-E1. Dies, sowie die Ergebnisse mit reiner Kalbsthymus-DNA weisen darauf hin, dass zusätzlich zum Metabolismus der CEs noch andere Faktoren bei der Induktion der DNA-Strangbrüche eine Rolle gespielt haben. Unabhängig von zellulären Einflüssen und dem Metabolismus war das strangbrechende Potential der vier CEs an Kalbsthymus-DNA gleich und nicht identisch mit den Ergebnissen in V79-

Zellen. Kalbsthymus-DNA wird oft verwendet, um genotoxische Effekte unabhängig von zellulären Einflüssen zu testen [Chen et al. (1998); Miura et al. (2000a); Mobley et al. (1999)]. Zur Detektion der DNA-Strangbrüche in Kalbsthymus-DNA wurde die Empfindlichkeit dieser Methode durch Zugabe von Cu^{2+} und $\text{NADH} + \text{H}^+$, zum Ankurbeln des Redoxcyclings, erhöht. Dies beschrieben auch Chen et al. (2005b) und Hurh et al. (2004). Hier führte eine Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Cu^{2+} zu $20 \mu\text{M}$ 4-HO-E2 bzw. 2-HO-E2 zu einer deutlichen Steigerung der DNA-Strangbruchraten in ϕX174 Phagen-DNA bzw. zu einer erhöhten Menge an 8-Oxo-7,8-Dihydroxy-2'-Desoxyguanosin in Kalbsthymus-DNA. Li et al. (1994) beschreibt ein Modell der Bildung von DNA-Strangbrüchen und oxidativen Schäden durch 2-HO-E2 und Cu^{2+} . Dabei spielt die Bindung des Cu^{2+} an DNA-Basen, bevorzugt an Guanin, eine Rolle. Das CE wird in Anwesenheit von O_2 und Cu^{2+} oxidiert. Dabei wird Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert und gleichzeitig H_2O_2 generiert. Die Interaktion eines DNA- Cu^+ -Komplexes mit H_2O_2 liefert dann ROS, die zu DNA-Strangbrüchen und oxidativen Schäden führen. Da der Kupfergehalt in verschiedenen Geweben zwischen 10 und $100 \mu\text{M}$ liegt, wovon ca. 20% im Zellkern lokalisiert sind, kann dieser Mechanismus auch in kultivierten Zellen zur Entstehung von DNA-Strangbrüchen und oxidativen Schäden beitragen. Außerdem ist denkbar, dass das gebildete Cu^+ mit dem H_2O_2 einen Cu^+ -Hydroperoxo-Komplex bildet, der dann DNA-Schäden erzeugen kann [Hiraku et al. (2001)]. Bei Hiraku et al. (2001) konnte durch die Zugabe von $100 \mu\text{M}$ NADH die durch 2-HO-E2 bzw. 4-HO-E2 ($1 \text{ nM} - 1 \mu\text{M}$) und Cu^{2+} ($20 \mu\text{M}$) gemessene Menge an 8-Oxo-7,8-Dihydroxy-2'-Desoxyguanosin in Kalbsthymus-DNA stark erhöht werden. Das $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert die gebildeten Chinone und Semichinonradikale zu den entsprechenden CEs und steigert somit die Generierung von ROS. Wie beschrieben, induzierten die CEs auch in Kalbsthymus-DNA Strangbrüche. Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsdurchführungen ist die Höhe der induzierten Strangbrüche in Zellen und an reiner DNA jedoch nicht miteinander vergleichbar.

Bei allen Zellkulturexperimenten musste auf die Instabilität der CEs geachtet werden. Diese Instabilität könnte in Autoxidationsprozessen begründet sein, wobei keine Oxidations- bzw. Zerfallsprodukte detektiert werden konnten. Eine andere Möglichkeit ist, dass die CEs an Bestandteile des FKS binden. Die Bindung von Steroidhormonen an Serumproteine ist schon lange bekannt, aufgrund ihrer Lipophilie erfolgt ihr Transport im Blut auch gebunden an Serumproteinen [Westphal (1977)]. Die CEs sind polarer als z.B. E2, scheinen aber die Fähigkeit zur Bindung an Serumproteine nicht verloren zu haben. Für die Bindung an Mediumbestandteile (z.B.

Aminosäuren), auch ohne Anwesenheit von FKS, sprechen die Gehalte der CEs im Zellkulturmedium ohne FKS. Auch dort sind die detektierten Mengen an CEs niedriger als im Kaliumphosphat-Puffer. Im Vergleich zur Positivkontrolle t-BuOOH war die Anzahl an DNA-Strangbrüchen, induziert durch CEs, vor allem in MCF-7- und HepG2-Zellen sehr gering. Nach einer Untersuchung von Thibaut et al. (2004) verringert sich die Fähigkeit der CEs, Cu^{2+} zu Cu^{+} zu reduzieren, bei Lagerung der CEs bei -20°C . Die CEs waren dabei in Ethanol gelöst. In dieser Arbeit wurden in DMSO gelöste CEs verwendet. Ihre Reduktionsfähigkeit in Abhängigkeit der Lagerung wurde nicht überprüft. Allerdings wurde bei Thibaut et al. (2004) die nach der Lagerung tatsächlich vorhandene CE-Konzentration in der Lösung nicht ermittelt. Deshalb könnte die detektierte Verminderung der Reduktionsfähigkeit auch auf geringere CE-Konzentrationen, im Vergleich zur Ausgangslösung, infolge der Instabilität der CEs zurückzuführen sein. Die Instabilität der CEs in Zellkulturmedium hatte in dieser Arbeit bei der Messung von DNA-Strangbrüchen aufgrund der kurzen Inkubationszeiten und der gleichen Instabilität der vier CEs keine Auswirkungen auf die nachgewiesenen Effekte.

4.3. Beeinflussung des Phase II-Metabolismus der CEs durch exogene und endogene Substanzen

In Körperzellen liegen alle vier CEs nebeneinander vor. Diese Situation wurde in MCF-7- bzw. HepG2-Zellen imitiert, in dem diese beiden Zelllinien mit zwei unterschiedlichen CEs parallel inkubiert wurden. Aufgrund der Konkurrenz der beiden jeweils vorhandenen CEs um die Bindungsstelle der COMT wurde die Methylierung eines CEs bei Anwesenheit des zweiten CEs gehemmt. Dies würde somit einer gegenseitigen kompetitiven Hemmung der CEs entsprechen. Die Folge wären höhere intrazelluläre CE-Spiegel im Vergleich zu Inkubationen mit nur einem CE, was sich auch auf die genotoxischen Effekte der CEs auswirken könnte. Bei der Coinkubation von 2-HO-E2 und 4-HO-E2 in HepG2-Zellen wurde hingegen eine gesteigerte 2-HO-E2-Methylierung erhalten, während die Methylierung von 4-HO-E2 gleichzeitig gehemmt wurde. Roy et al. (1990) konnte in einem *in vitro* Test mit isolierter COMT aus Rattenleber auch eine Hemmung der 4-HO-E2-Methylierung durch 2-HO-E2 nachweisen, jedoch nicht umgekehrt. Somit wäre in diesem Fall die Bildung des biologisch aktiven 2-MeO-E2 bevorzugt. Allerdings ist nicht bekannt, ob dieser Effekt immer noch auftritt, wenn auch die beiden anderen CEs vorhanden sind. Dies würde der *in vivo*

Situation entsprechen. Es gibt zusätzlich Untersuchungen, in denen beobachtet wurde, dass die CEs ihre Glucuronidierung gegenseitig hemmen können [Cheng et al. (1998)], was auch zu höheren CE-Gehalten in den Zellen führen könnte.

Das Flavonol Quercetin stellt, als Beispiel für ein exogenes Catechol, ein sehr gutes Substrat der COMT dar. Wie die Isoflavone gehört das Quercetin zur großen Gruppe der Flavonoide. Ihm werden antioxidative und antiinflammatorische Wirkungen zugesprochen. Aufgrund der Catecholstruktur ist jedoch auch die Oxidation zum Chinon und nachfolgendes Redoxcycling möglich, weshalb *in vitro* genotoxische Effekte beobachtet wurden. Diese konnten jedoch *in vivo* oft nicht bestätigt werden. Quercetin ist aber ebenfalls ein starker exogener Inhibitor der COMT [van Duursen et al. (2004); Zhu et al. (1994); Zhu und Liehr (1996); Zhu (2002)]. Diese Hemmung wurde zum einen auf die direkte kompetitive Hemmung des Quercetins zurückgeführt, zum anderen auf die nicht-kompetitive Hemmung des bei der Methylierung gebildeten SAH und die verminderte Verfügbarkeit von SAM [Lavigne et al. (2001); Zhu und Conney (1998b); Zhu und Liehr (1996)]. In dieser Arbeit war Quercetin in der Lage, die Methylierung von 2-HO-E2 bei MCF-7-Zellen zu steigern. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass die dauerhaft hohe intrazelluläre Catecholkonzentration die COMT stabilisierte bzw. die MCF-7-Zellen zur vermehrten COMT-Expression stimulierte. Dadurch könnte die Methylierung der CEs verstärkt und ihre Konzentration verringert werden. Die CEs und das Quercetin lagen dabei jedoch nicht nebeneinander vor, so dass die inhibitorischen Eigenschaften des Quercetins im Bezug auf die COMT nicht zum Tragen kamen.

Da die Isoflavone keine Catecholstruktur besitzen, stehen sie nicht in direkter Konkurrenz um das aktive Zentrum der COMT. Trotzdem konnte in einer Untersuchung von van Duursen et al. (2004) Genistein in der höchsten eingesetzten Konzentration (30 μ M) die Methylierung von 2-HO-E2 bzw. 4-HO-E2 im Cytosol von humanem Brustgewebe leicht hemmen. Somit ist es auch möglich, dass die Isoflavone in der Lage sind, die Expression der COMT zu verändern, wenn Zellen längere Zeit mit ihnen inkubiert werden. Durch Behandlung von MCF-7- bzw. HepG2-Zellen mit Isoflavonen konnte eine Verminderung der COMT-Aktivität nachgewiesen werden, was ein Hinweis auf eine veränderte COMT-Expression sein könnte. Genistein hatte dabei einen stärkeren Effekt als Daidzein. Bereits Lehmann et al. (2008) konnten nach Isoflavoninkubation (24 h) einen Rückgang der COMT-mRNA und der COMT-Aktivität in kultivierten MCF-7-Zellen nachweisen. In diesen Studien wurde gezeigt, dass diese Effekte auch bei deutlich niedrigeren Isoflavonkonzentrationen (100 nM - 10 μ M) auftreten,

die durchaus mit dem Verzehr isoflavonreicher Nahrung oder Nahrungssupplementen erreicht werden können. Eine Folge der verminderten COMT-Expression durch die Isoflavone können höhere intrazelluläre CE-Spiegel sein, die zur E2-vermittelten Tumorentstehung beitragen könnten. Die Rolle der COMT im Bezug auf die Entstehung hormonabhängiger Tumoren wurde bereits erläutert.

Mit Chrysin ist ein Flavonoid bekannt, das die Expression verschiedener Isoenzyme der UGT1A-Familie in humanen Darmkrebszellen (Caco-2) oder in HepG2-Zellen induziert [Galijatovic et al. (2001); Walle et al. (2000)]. Appelt und Reicks (1999) untersuchten u.a. die UGT-Aktivität in Mikrosomen, gewonnen aus verschiedenen Darmabschnitten und der Leber von männlichen SD Ratten. Diese wurden zuvor zwei Wochen mit einer isoflavonreichen Diät (162 mg Isoflavone/kg Diät) gefüttert. Dabei führte die isoflavonreiche Diät zu einer Erhöhung der UGT-Aktivität. Dies zeigt, dass Flavonoide in der Lage sind, die UGT-Expression zu beeinflussen. Der in dieser Arbeit nachgewiesene Effekt der beiden Isoflavone auf die UGT-Aktivität in HepG2-Zelllysat war jedoch wesentlich geringer als die ermittelte Steigerung der COMT-Aktivität durch Quercetin und ist damit vernachlässigbar. Bei diesen Versuchen war der Gehalt von Genistein im Zelllysate von HepG2-Zellen aber zehnmal so hoch wie der des Daidzeins. Ruefer (2005) konnte in V79-Zellen bei Inkubationen mit Genistein ebenfalls eine stärkere Akkumulation nachweisen als bei Daidzein. Jedoch war sie im Vergleich zum Daidzein nur doppelt so hoch. Als Ursache wurde hier die Ausbildung intrazellulärer Wasserstoffbrücken zwischen der Hydroxylgruppe an Position 5 und der Ketogruppe an Position 4 diskutiert. Dadurch hätte das Genistein einen lipophileren Charakter als es durch die drei Hydroxylgruppen zu erwarten wäre und folglich eine höhere Affinität zu Membranen als Daidzein. Die starke Anreicherung des Genisteins in Zellen könnte eine Ursache für die verschiedenen genotoxischen Effekte *in vitro* sein, die für das Genistein, aber nicht bzw. nur in sehr geringem Ausmaß für das Daidzein nachgewiesen wurden [Di Virgilio et al. (2004); Kulling und Metzler (1997); Kulling et al. (2002)]. Ruefer (2005) zeigte jedoch auch, dass Genistein nicht in allen Zellen stärker akkumuliert als Daidzein. In humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes konnte eine stärkere Anreicherung von Daidzein nachgewiesen werden. Durch den hohen Genisteingehalt in HepG2-Zelllysate entstand zusätzlich eine direkte Konkurrenz mit den CEs um das aktive Zentrum der UGTs, welche die Glucuronidierung der CEs jedoch nicht beeinflusste. Die Genisteinglucuronidierung wurde allerdings in Anwesenheit eines CE sehr stark gehemmt. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass, in Anwesenheit von Genistein, die CEs vorrangig glucuronidiert wurden. Au-

ßerdem konnte durch Genisteininkubationen zusätzlich eine erhöhte HSD-Aktivität beobachtet werden. Wie bereits erläutert, trägt dieses Enzym in HepG2-Zellen zur Inaktivierung der CEs bei. Eine HSD-Induktion könnte, wie bei den UGTs, zu niedrigeren CE-Spiegeln führen und deshalb protektive Wirkung haben. Da die Induktion hier jedoch sehr gering ausfiel, ist diese *in vivo* vernachlässigbar.

5. Zusammenfassung

Das Steroidhormon 17 β -Estradiol (E2) sowie seine reaktiven Metaboliten, die Catecholestrogene (CEs), werden mit der Entstehung hormonabhängiger Krebserkrankungen, wie Brust-, Uterus- und Prostatatumoren, in Verbindung gebracht. Deshalb wurde in dieser Arbeit ihre Inaktivierung im Rahmen des Phase II-Metabolismus untersucht. Beim E2 lag dabei der Schwerpunkt auf der Glucuronidierung. Die CEs wurden bezüglich ihrer Methylierung und Glucuronidierung analysiert.

Das E2 wurde an zwei Positionen glucuronidiert, an Position 3 bzw. 17. Mit humanen Lebermikrosomen (HLM) und Rattennierenmikrosomen (RNM) überwog die E2-3-Glucuronidierung, während mit Rattenlebermikrosomen fast ausschließlich E2-17-Glucuronid gebildet wurde. Außerdem war E2 bei Glucuronidierungen mit HLM bzw. RNM in der Lage seine Glucuronidierung an Position 3 zu aktivieren. Auch das Isoflavon Daidzein steigerte die E2-3-Glucuronidierung mit HLM, mit RNM konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Die E2-17-Glucuronidierung mit HLM wurde durch Daidzein gehemmt. Das Isoflavon Genistein verminderte die E2-3-Glucuronidierung mit HLM, auf die Glucuronidierung an Position 17 hatte es keinen Einfluss. In intakten Zellen konnte die E2-Glucuronidierung nicht untersucht werden, da kein geeignetes Testsystem gefunden wurde.

Bei der Untersuchung der CE-Methylierung durch die Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT) konnten mit humanem Lebercytosol sowie mit Lysat von Hamster-Lungenfibroblasten (V79), humanen Brustkrebszellen (MCF-7) und humanen Leberkrebszellen (HepG2) für 2-HO-E2 und 2-HO-E1 beide möglichen Methylierungsprodukte nachgewiesen werden. 4-HO-E2 bzw. 4-HO-E1 wurden dagegen nur an Position 4 methyliert. Es zeigte sich, dass die Methylierung vor allem für die Inaktivierung der 2-HO-CEs wichtig ist. Neben der COMT waren im V79- bzw. HepG2-Zelllysat 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDs) aktiv, die sowohl die Oxidation von E2 zu E1 als auch die E1-Reduktion katalysieren können. Mit Zelllysat der beiden genann-

ten Zelllinien wurde die Oxidation der CEs 2-HO-E2 bzw. 4-HO-E2 zu 2-HO-E1 sowie 4-HO-E1 detektiert. Des Weiteren konnte mit V79-Zelllysate die Reduktion von 2-HO-E1 und 4-HO-E1 nachgewiesen werden. MCF-7-Zelllysate besaßen dagegen keine aktiven HSDs. Die selben Ergebnisse wurden erhalten, wenn das Zellkulturmedium von mit CEs inkubierten MCF-7- bzw. HepG2-Zellen analysiert wurde. Dies bedeutet, dass die Methylierungsprodukte auch in intakten Zellen gebildet wurden.

Bei Coinkubationen von jeweils zwei verschiedenen CEs wurde im Inkubationsmedium von MCF-7- und HepG2-Zellen nachgewiesen, dass die Methylierung der CEs, aufgrund der Konkurrenzsituation, vermindert wurde, sobald ein zweites CE vorhanden war. Dabei wurde die Methylierung von 4-HO-E2/-E1 stärker gehemmt als die von 2-HO-E2/-E1. Mit HepG2-Zellen trat jedoch bei der Coinkubation von 2-HO-E2 und 4-HO-E2 eine Aktivierung der 2-HO-E2-Methylierung bei gleichzeitiger Hemmung der 4-HO-E2-Methylierung auf. Die Isoflavone Daidzein und Genistein zeigten sowohl bei Verwendung von MCF-7- als auch bei HepG2-Zellen einen hemmenden Effekt auf die Methylierung von 2-HO-E2. Dabei hemmte Genistein stärker als Daidzein. Im Gegensatz dazu steigerte das Flavonol Quercetin die 2-HO-E2-Methylierung.

Die Glucuronidierung der CEs wurde mit HLM und HepG2-Zelllysate untersucht, da V79- und MCF-7-Zellen keine bzw. eine zu geringe UDP-Glucuronyltransferase (UGT)-Aktivität besaßen. Für jedes CE konnte mit beiden Testsystemen ein Glucuronid nachgewiesen werden. Mit HLM zeigte sich, dass die CEs, vor allem das 4-HO-E1, deutlich besser glucuronidiert wurden als E2. Die CEs sowie ihre Methylierungsprodukte waren aber nicht in der Lage ihre eigene Glucuronidierung zu aktivieren, da der Glucuronidierung dieser E2-Metaboliten mit HLM keine Hill-Kinetik (Aktivierungskinetik) zugrunde lag. Auch die Glucuronidierung von E2 wurde durch die CEs bzw. ihre Methylierungsprodukte nicht aktiviert. Die CE-Glucuronidierung mit HLM blieb durch den Zusatz von Daidzein unverändert. Daidzein konnte jedoch die Glucuronidierung des Methylierungsproduktes 2-MeO-E2 hemmen. Diesem Metaboliten werden protektive Eigenschaften, wie z.B. die Hemmung der Tumorzellproliferation und der Angiogenese, nachgewiesen. Mit HepG2-Zelllysate konnte gezeigt werden, dass die Glucuronidierung vor allem für die Inaktivierung von 4-HO-E2 bzw. 4-HO-E1 eine große Rolle spielt. Dabei wurde, wie bei den Untersuchungen mit HLM, 4-HO-E1 am besten glucuronidiert. 4-HO-E2 war ebenfalls ein gutes Substrat für die UGTs. Der bevorzugte Metabolisierungsweg von 4-HO-E2 stellte jedoch die Oxidation zum 4-HO-E1, katalysiert durch HSDs, und dessen nachfolgende Glucuronidierung dar.

Die Isoflavone Daidzein und Genistein hatten auf die Glucuronidierung der CEs mit HepG2-Zelllysat nur eine geringe aktivierende Wirkung. Da keine der untersuchten Methoden geeignet war, um die polaren Glucuronide in Zellkulturmedium zu detektieren, blieb der Nachweis einer Bildung von CE-Glucuroniden in intakten Zellen aus.

Die CEs können über die Oxidation zu Semichinonen bzw. Chinonen und anschließend Redoxcycling reaktive Sauerstoffspezies bilden und besitzen deshalb genotoxisches Potential. In dieser Arbeit wurde die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch CEs in den drei bereits bei der Untersuchung des CE-Metabolismus eingesetzten Zelllinien (V79, MCF-7 und HepG2) bestimmt. Aufgrund geringer Strangbruchraten, vor allem in MCF-7- und HepG2-Zellen, wurden verschiedene Methoden wie z.B. die Miterfassung oxidativer DNA-Schäden, die Verpackung der instabilen Catechole in Liposomen oder der Einsatz des COMT-Inhibitors Ro 41-0960 zur Erhöhung der DNA-Schäden getestet. Keine dieser Methoden brachte jedoch den gewünschten Erfolg. Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass die CEs in V79-Zellen, welche die CEs, im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien, am schlechtesten metabolisierten, die größte Anzahl an DNA-Strangbrüchen induzierten. Dagegen war die DNA-Strangbruchrate in HepG2-Zellen, die metabolisch am aktivsten waren, gering, und es konnten nur noch bei 4-HO-E1 in den höchsten eingesetzten Konzentrationen DNA-Strangbrüche detektiert werden. Die ermittelten DNA-Strangbruchraten in MCF-7-Zellen lagen zwischen den bereits genannten Zelllinien. Somit konnte im Hinblick auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch CEs eine Abhängigkeit vom Metabolismus der CEs gezeigt werden. Unabhängig vom Metabolismus und von anderen zellulären Einflüssen, beim Einsatz von reiner Kalbsthymus-DNA, war die detektierte DNA-Strangbruchrate bei allen vier CEs gleich.

6. Material und Methoden

6.1. Geräte, Chemikalien und Lösungen

6.1.1. Geräte und Hilfsmittel

Zellfraktionierung	Potter S (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) Pinzette Schere Ultrazentrifuge Centrikon T-1080 (Kontron Instruments)
Zellkultur	Brutschrank Hera Cell (Heraeus, Hanau) Sterilbank Hera Safe (Heraeus, Hanau) Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40 C; Objektive: 5x/0, 12 Ph0, 10x/0, 25 Ph1 (Zeiss, Oberkochen) Pipetus (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt) Neubauerzählkammer Gasbrenner gasprofi 2 SCS (WLD-Tec, Göttingen) Wasserbad (Memmert, Schwabach) Autoklav (RS Laborgeräte, Heidelberg) Stickstofftank GT40 (Air Liquide, Düsseldorf)
AU	Labor-Inkubator (Heraeus, Hanau) Ultraschall-Desintegrator Sonifier II W-450 mit Ultraschallspitze (Branson, Hannover) Wasserbad SW-20C (Julabo, Seelbach)
Liposomenpräparation	Rotationsverdampfer VV60 (Heidolph, Schwabach) mit Wasserbad (Büchi, Essen) und Vakuumpumpe mit Druckregler (Vacuubrand, Wertheim)
Biofreezer	GFL, Burgwedel
Evaporatorzentrifuge	RC 10.10 mit Kühlfalle RCT 90 (Jouan GmbH, Unterhaching)
Kühlschrank	Premium (Liebherr, Bulle, Schweiz)
pH-Meter	CG 817 mit pH-Elektrode BlueLine 12 (Schott)

Pipetten	Eppendorf Reference 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 50 - 200 µl, 100 - 1000 µl (Eppendorf, Hamburg) Multipette plus, (Eppendorf, Hamburg) Abimed Discovery 1000 - 5000 µl (Abimed, Langenfeld)
Thermomixer	Eppendorf 5436 (Eppendorf, Hamburg) Eppendorf comfort (Eppendorf, Hamburg)
Photometer	UV/Vis-Spektralphotometer Uvikon 869 (Kontron Instruments)
Mikrotiterplattenlesegerät	GENios (Tecan, Crailsheim) mit Auswertesoftware XFluor
Vortex	Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA)
Waagen	Analysenwaage Sartorius handy; Typ H51 (Sartorius AG, Göttingen) Präzisionswaage Sartorius excellence; Typ E2000D (Sartorius AG, Göttingen)
Zentrifugen	Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg) Megafuge 1.0R (Heraeus, Hanau) Mikroliter (Hettich GmbH und Co KG, Tuttlingen)
Vakuumpumpen	ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz
Magnetrührer	IKAMAG RET-G (IKA Labortechnik, Staufen)

6.1.2. Verbrauchsmaterialien

Kryoröhrchen	2 ml (Neolab, Heidelberg)
Halb-Mikro-Küvetten	Plastik (Sarstedt, Nürnberg)
Pipettenspitzen	Plastik; 10 µl, 200 µl, 1000 µl (Sarstedt, Nürnberg) Plastik; 5000 µl (Eppendorf, Hamburg)
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße	1, 5 ml, 2 ml (Sarstedt, Nürnberg)
Zellkulturschalen	Ø 150 mm (Biochrom AG, Berlin) Ø 100 mm (Biochrom AG, Berlin) Ø 60 mm (Biochrom AG, Berlin) Ø 40 mm (Biochrom AG, Berlin)
Mikrotiterplatten	24 Well (Sarstedt, Nürnberg) 96 Well (Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA)
Sterilfilter	Porengröße 0,2 µm (Roth, Karlsruhe); Bottle Top Filters, Porengröße 0,2 µm, 500 ml (Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA)

Omnifix 2 ml Einmalspritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Glasfaserfilter	Whatman, Maidstone, UK
Zentrifugenröhrchen	15 ml (Sarstedt, Nürnberg), 50 ml (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
Faltenfilter	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel

6.1.3. Chemikalien

Nicht näher spezifizierte Chemikalien stammten von VWR/Merck (Darmstadt), Sigma/Aldrich/Fluka (Taufkirchen), Serva (Heidelberg) oder Carl Roth (Karlsruhe) in der Reinheit mind. "zur Analyse".

Estrogene

E2	Steraloids, Newport, Rhode Island, USA
E1	Steraloids, Newport, Rhode Island, USA
E3	Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen
E2-3-G	Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen
E2-17-G	Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen
2-HO-E2	Steraloids, Newport, Rhode Island, USA
4-HO-E2	Steraloids, Newport, Rhode Island, USA
2-HO-E1	Steraloids, Newport, Rhode Island, USA
4-HO-E1	Steraloids, Newport, Rhode Island, USA
2-MeO-E2	Steraloids, Newport, Rhode Island, USA
4-MeO-E2	Steraloids, Newport, Rhode Island, USA
2-MeO-E1	Steraloids, Newport, Rhode Island, USA
4-MeO-E1	Steraloids, Newport, Rhode Island, USA

Enzyme

β-Glucuronidase	aus Rinderleber, 1240000 U/g (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen)
Katalase	76575 U/mg Protein, 20 mg Protein/ml (Serva, Heidelberg)

Zellkultur

DMEM	mit Phenolrot, L-Glutamin, 4,5 g/l Glucose und 0,11 g/l Natriumpyruvat; ohne Natriumbicarbonat (MP Biomedicals, Heidelberg); Pulvermedium
	mit Phenolrot, L-Glutamin, 4,5 g/l Glucose; ohne Natriumpyruvat und Natriumbicarbonat (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen); Pulvermedium

DMEM/F12	mit Phenolrot, L-Glutamin, 4,5 g/l Glucose, 0,11 g/l Natriumpyruvat und 3,7 g/l Natriumbicarbonat (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen); Flüssigmedium mit Phenolrot, L-Glutamin, 3,15 g/l Glucose, und 15 mM HEPES; ohne Natriumbicarbonat (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen)
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	5000 U/ml Penicillin, 5 mg/ml Streptomycin (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen)
Trypsinlösung, 10x	25 g Trypsin/l (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen)
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe

Gase

Helium	4.6 (Air Liquide, Düsseldorf)
Kohlendioxid	Air Liquide, Düsseldorf
Stickstoff	5.0 (Air Liquide, Düsseldorf)

6.1.4. Biologisches Material

Zelllinien

V79-Zellen	Lungenfibroblasten des männlichen Chinesischen Hamsters (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig), kultiviert in DMEM (MP Biomedicals, Heidelberg) mit 10% FKS
MCF-7-BUS 127-Zellen	humane Brustkrebszellen (zur Verfügung gestellt von Ana M. Soto (Tufts University School of Medicine, Boston, Massachusetts, USA)), kultiviert in DMEM (MP Biomedicals, Heidelberg) mit 5% FKS
HepG2-Zellen	humane Leberkrebszellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig), kultiviert in DMEM/F12 mit 10% FKS

Alle Medien enthielten zusätzlich Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre inkubiert.

Versuchstiere

Männliche SD Ratten mit einem Gewicht von 200 - 300 g wurden für die Präparation der RLM und RNM verwendet. Sie wurden von der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen) bezogen und in Standard-Käfigen gehalten. Der Hell-Dunkel-Rhythmus betrug 12 h, und die Ratten bekamen Wasser sowie kommerzielles Laborfutter *ad libitum*.

6.1.5. Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurde Reinstwasser aus der Reinstwasseranlage (Serie Ultra Clear, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel) verwendet.

6.1.5.1. Puffer für die Präparation von Zellfraktionen

Mic-I-Puffer

Reagenzien	g/l	mM
KCl	11,18	150
Tris	6,06	50
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	0,372	1

Lösen, mit konzentrierter HCl auf pH 7,4 einstellen und mit H₂O auf 1 l auffüllen.

Mic-II-Puffer

Reagenzien	g/l	mM
HEPES	5,96	25
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	0,558	1,5
1,4-Dithiothreitol	0,154	1
NaCl	5,84	100

Lösen, mit NaOH auf pH 7,6 einstellen und nach Zugabe von 105 ml Glycerin (99%) mit H₂O auf 1 l auffüllen.

6.1.5.2. Farbreagenz für die Proteinbestimmung nach Bradford

10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 5 ml Ethanol lösen, 10 ml *ortho*-Phosphorsäure (85%) zugeben, mit H₂O auf 100 ml auffüllen und filtrieren.

6.1.5.3. Lösungen für die In vitro Assays

0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4)

0,1 M K_2HPO_4 : 17,418 g K_2HPO_4 einwiegen und mit H_2O auf 1 l auffüllen.

0,1 M KH_2PO_4 : 13,609 g KH_2PO_4 einwiegen und mit H_2O auf 1 l auffüllen.

0,1 M K_2HPO_4 vorlegen und mit der sauren Komponente den pH-Wert auf 7,4 einstellen.

Alamethicin

1 mg Alamethicin in 0,1 ml Methanol lösen (10 mg/ml), auf 8 ml mit 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) auffüllen (125 µg/ml). Die so hergestellte Lösung wird in einer Endkonzentration von 25 µg/ml im Glucuronidierungsassay eingesetzt.

0,7 M Glycin-HCl-Puffer (pH 1,2)

78,4 g Glycin-Hydrochlorid einwiegen, mit konzentrierter HCl auf pH 1,2 einstellen und mit H_2O auf 1 l auffüllen.

0,15 M Natriumacetat-Puffer (pH 5,0)

12,31 g Natriumacetat einwiegen, mit konzentrierter Essigsäure auf pH 5,0 einstellen und mit H_2O auf 1 l auffüllen.

6.1.5.4. Lösungen für die Zellkultur

Pulvermedien

Die Pulvermedien wurden in Wasser gelöst. Dabei wurde die entsprechende Menge Natriumbikarbonat (2,25 g/l (DMEM, MP Biomedicals); 1,2 g/l (DMEM/F12, Sigma/Aldrich); 3,7 g/l (DMEM, Sigma/Aldrich)) zugesetzt. Es folgte die Einstellung des pH-Wertes auf 6,8 - 6,9, das restliche Auffüllen mit H_2O auf 1 l sowie das Sterilfiltrieren.

PBS (pH 7,4)

Reagenzien	g/l	mM
NaCl	5,84	100
KCl	0,335	4,5
Na ₂ HPO ₄	0,994	7
KH ₂ PO ₄	0,408	3

Lösen, mit 1 N NaOH auf pH 7,4 einstellen, mit H₂O auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren.

Trypsinlösung (0,25%)

PBS-EDTA, pH 7,4 PBS wie oben beschrieben herstellen, zusätzlich noch 200 mg/l EDTA einwiegen.

20 ml Trypsinlösung (10x) sterilfiltrieren und mit 180 ml der sterilen PBS-EDTA-Lösung (pH 7,4) versetzen.

6.1.5.5. Lösungen für die AU

Alle eingesetzten Stammlösungen, mit Ausnahme der 0,1 N NaOH, wurden vor ihrer Verwendung sterilfiltriert.

Alkalische Lösung (pH 12,3)

Reagenzien	Menge/100 ml	M
NaCl	5,25 g	0,9
0,5 M Na ₂ HPO ₄	2 ml	0,01
1 N NaOH	3 ml	0,03

Alkalische Lösung (pH 11,48)

Reagenzien	Menge/100 ml	M
NaCl	5,25 g	0,9
0,5 M Na ₂ HPO ₄	2 ml	0,01
1 N NaOH	0,9 ml	0,009

Bis kurz unter die 100 ml Marke mit H₂O auffüllen und den pH-Wert mit 1 N NaOH auf pH 11,48 einstellen.

Alkalische Lösung zur Bestimmung der oxidativen DNA-Schäden

Reagenzien	Menge/100 ml	M
1 N NaOH	10,75 ml	0,108
0,1 M EDTA, pH 8	20 ml	0,02
NaCl	4,06 g	0,69

Lysepuffer (pH 7,5)

Reagenzien	Menge/l	M
0,5 M Na ₂ HPO ₄	12 ml	0,006
0,5 M KH ₂ PO ₄	2 ml	0,001
NaCl	8,006 g	0,137
KCl	0,224 g	0,003
Triton X-100 (10%)	10 ml	erst am Versuchstag zugeben

Salzlösung (pH 8,0)

Reagenzien	Menge/l	M
NaCl	116,88 g	2
0,1 M EDTA, pH 8	100 ml	0,01
0,1 M Tris, pH 8	40 ml	0,002

Fpg-Puffer (pH 8,0)

Reagenzien	ml/l	M
0,5 M NaH ₂ PO ₄	16	0,008
0,5 M Na ₂ HPO ₄	84	0,042
0,1 M EDTA, pH 8	100	0,01

0,01 M Natriumphosphat-Puffer (pH 6,9)

Reagenzien	ml/l	M
0,5 M Na ₂ HPO ₄	9,8	0,005
0,5 M NaH ₂ PO ₄	10,2	0,005

0,5 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,9)

Reagenzien	ml/l	M
0,5 M KH_2PO_4	510	0,255
0,5 M K_2HPO_4	490	0,245

0,35 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,9)

Reagenzien	ml/l	M
0,5 M KH_2PO_4	357	0,179
0,5 M K_2HPO_4	343	0,172

0,15 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,9)

Reagenzien	ml/l	M
0,5 M KH_2PO_4	153	0,077
0,5 M K_2HPO_4	147	0,074

Lösung des Höchst-Farbstoffes 33258

6,24 mg des Farbstoffes werden in 1 ml H_2O gelöst (10 mM). Daraus wird eine 0,3 mM Lösung hergestellt, aliquotiert und bis zur Verwendung im Dunkeln bei -20°C gelagert.

6.1.5.6. Lösungen für den MTT-Test**MTT-Lösung**

50 mg MTT-Bromid werden in 10 ml sterilem PBS (pH 7,4) gelöst, mit $0,2\text{ }\mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert und in Form von 2 ml Aliquots bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Lysepuffer

10 g SDS werden eingewogen und in einer Mischung aus 99,4 ml DMSO und 0,6 ml konzentrierter Essigsäure gelöst.

6.1.5.7. 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) mit Zusatz von 0,15 M NaCl für die Liposomenherstellung

0,1 M K_2HPO_4 + 0,15 M NaCl: 17,418 g K_2HPO_4 + 8,77 g/l NaCl

0,1 M KH_2PO_4 + 0,15 M NaCl: 13,609 g KH_2PO_4 + 8,77 g/l NaCl

Einwiegen und mit H_2O auf 1 l auffüllen. 0,1 M K_2HPO_4 + 0,15 M NaCl vorlegen und mit der sauren Komponente den pH-Wert auf 7,4 einstellen.

6.2. Methoden

6.2.1. HPLC-Analytik

Es wurde ein Hochdruck-Gradientensystem der Serie Beckman System Gold mit binärer Pumpe (125 Solvent Module) und UV/VIS-Detektor (166) verwendet. Zur Erfassung und Analyse der Daten stand die Software Beckman Gold Nouveau, Version 1.6 zur Verfügung.

Manueller Injektor	Injektionsventil Modell 7725i (Rheodyne)
Vorsäule	Security Guard C18 (ODS), 4,0 x 3,0 mm i.d. (Phenomenex, Aschaffenburg)
Reversed Phase-Säule	Luna C18(2), 250 x 4,6 mm i.d., 5 μm Partikelgröße (Phenomenex, Aschaffenburg)
Flußrate	1 ml/Min
Eluent A	H_2O (pH 3,0), eingestellt mit konzentrierter Ameisensäure
Eluent B	Acetonitril (Acros Organics BVBA, Geel, Belgien)

Die Fließmittel wurden vor ihrer Verwendung mit Helium entgast. In Tabelle 6.1 ist ein Gradient abgebildet, mit dem beispielsweise E2, E1, E3 sowie ihre Glucuronide detektiert wurden. Dieser Gradient wurde dann der jeweiligen Problemstellung angepasst. Alle Estrogene sowie das Quercetin wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert, die Isoflavone bei 250 nm und TFMU bei 320 nm.

Tabelle 6.1.: Gradient für die Detektion von E2, E1, E3 sowie von ihren Glucuroniden.

Zeit (Min)	0	2	25	28
Eluent A (%)	83	83	30	0
Eluent B (%)	17	17	70	100

6.2.2. Präparation von Zellfraktionen

Mikrosomen und Cytosol wurden aus Lebern oder Nieren männlicher SD Ratten (Körpergewicht: 200 - 300 g) und aus der Leber eines männlichen Spenders isoliert. Die Vorgehensweise orientierte sich an Lake (1987). Die Rattenlebern bzw. -nieren wurden frisch nach der Entnahme aufgearbeitet. Die Humanleber lagerte bei -80°C und wurde für die Präparation aufgetaut. In eisgekühltem Mic-I-Puffer wurden die Gewebe gewogen, mit der Schere zerkleinert und im Potter unter Eiskühlung und Zugabe der dreifachen Menge (w/v) Mic-I-Puffer bei 500 rpm homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation des Homogenats bei $9000 \times g$ (15 Min, 4°C). Dabei wurden grobe Zellbestandteile, wie nicht aufgebrochene Zellen, Zellkerne, Mitochondrien, etc., abgetrennt. Der Überstand, die sog. S9-Fraktion, wurde bei $105000 \times g$ zentrifugiert (60 Min, 4°C) und das erhaltene Mikrosomenpellet vorsichtig aufgeschüttelt bis nur noch ein glasiger Glykogen-Rückstand blieb. Die Mikrosomensuspension wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und noch einmal für 60 Min bei $105000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Bei der Mikrosomen-Präparation aus Rattennieren entfiel die letzte Zentrifugation aufgrund des niedrigen Glykogengehaltes der Nieren. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand, das Cytosol, abgenommen und gemischt. Das Pellet, die Mikrosomen, wurde mit Mic-II-Puffer (0,75 ml/g Gewebe) versetzt und homogenisiert. Die Zellfraktionen wurden aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

6.2.3. Proteinbestimmung der Zellfraktionen und der Zellysate

Die Bestimmung des Proteingehaltes der hergestellten Zellfraktionen bzw. Lysate aus kultivierten Zellen folgte der Methode von Bradford (1976), deren Prinzip darauf beruht, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 im Sauren nach Bindung an Proteine eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm zeigt.

Es wurde eine geeignete Verdünnung der Proteinsuspension in Wasser (Gesamtvolumen: 100 μl) hergestellt und mit 1 ml der Farbreagenzlösung durchmischt. Nach 5 Min im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Detektion bei 595 nm gegen den Reagenzienblindwert. Mit Rinderserumalbumin wurde eine Kalibrierung zwischen 1 und 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erstellt. Sowohl mit den Standardlösungen als auch mit den Proben wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

6.2.4. In vitro Assays: Phase II-Reaktionen

6.2.4.1. Glucuronidierungsassay

Die Glucuronidierungsreaktionen wurden sowohl mit verschiedenen Substraten (E2, oxidative Metaboliten des E2, Isoflavone, TFMU) als auch mit verschiedenen biologischen Modellen (HLM, RNM, RLM, Zelllysate von MCF-7- bzw. HepG2-Zellen) nach einer modifizierten Methode von Fisher et al. (2000) bzw. Matern et al. (1994) in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) durchgeführt. Die Inkubationsbedingungen der einzelnen Glucuronidierungen sind in Tabelle 6.2 aufgezeigt. Sie wurden so gewählt, dass im linearen Bereich der UGTs gearbeitet wurde. Zuerst wurde die entsprechende Proteinmenge (s. Tabelle 6.2) mit dem Porenbildner Alamethicin (25 µg/ml) für 15 Min auf Eis vorinkubiert. Die Substratstammlösungen wurden in DMSO angesetzt. Der DMSO-Anteil im Glucuronidierungsansatz betrug 1%. Magnesiumchlorid, der β -Glucuronidase-Inhibitor Saccharinsäure-1,4-Lacton (Endkonzentration der beiden Substanzen im Ansatz: 10 mM) sowie die entsprechende Substratkonzentration (s. Tabelle 6.2) wurden zugesetzt und das Gemisch für 5 Min bei 37°C im Thermomixer vorinkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von UDPGA (Endkonzentration: 4 mM) gestartet und bei 37°C im Thermomixer für die in Tabelle 6.2 angegebenen Zeiten weiter inkubiert. Als Negativkontrolle diente die Glucuronidierung ohne das Cosubstrat UDPGA.

Tabelle 6.2.: Inkubationsbedingungen der einzelnen Glucuronidierungen. S, Substratkonzentration; P., Protein; t, Inkubationsdauer; Z., Zellen.

Substrat	S (µM)	Proteingehalt		t (Min)
		(mg P./ml)	(x 10 ⁶ Z./ml)	
E2 & oxidative Metaboliten	2,5 - 100	0,5 - 7	15 - 50	10 - 120
TFMU	20 - 100	–	5 - 50	30 - 60
Daidzein	2,5 - 50	0,5 - 1	–	30
Genistein	25	0,5	–	30

Bei E2 und seinen oxidativen Metaboliten (CEs, E1, E3, Methylierungsprodukte der CEs) wurde die Glucuronidierung durch Zugabe von 0,2 ml 0,7 M Glycin-HCl-Puffer (pH 1,2) abgestoppt und die Reaktionslösung mit Ethylacetat extrahiert (s. 6.2.4.4). Erfolgte die Glucuronidierung eines Isoflavons, wurde nach dem Abstoppen mit 0,7 M Glycin-HCl-Puffer (pH 1,2) das Protein durch Zentrifugation abgetrennt und der

wässrige Überstand direkt mit der HPLC analysiert (6.2.1). Bei der Glucuronidierung mit HepG2-Zelllysate, das aus Zellen hergestellt wurde, die zuvor für 48 h mit 20 µM Genistein inkubiert wurden, diente das in den Zellen angereicherte (und somit im Zelllysate enthaltene) Genistein als Substrat sowie das Zelllysate (50 x 10⁶ Zellen/ml) als UGT-Quelle. Die Inkubationszeit betrug hierbei 60 Min.

Wurden zwei Substrate parallel im Glucuronidierungsassay eingesetzt, erhöhte sich der DMSO-Anteil im Ansatz auf 2%. War das zweite Substrat ein oxidativer Metabolit des E2 wurde die Glucuronidierung wie für E2 und seine oxidativen Metaboliten beschrieben durchgeführt. Handelte es sich hingegen bei den beiden Substraten um E2 und Daidzein bzw. Genistein, wurde nach dem Abstoppen der Glucuronidierung mit 0,7 M Glycin-HCl-Puffer (pH 1,2) ein 50 µl-Aliquot nach der Beschreibung für die Isoflavone aufgearbeitet. Bei den restlichen 350 µl des Inkubationsgemisches erfolgte die Aufarbeitung wie schon für E2 erklärt.

Bei TFMU als Substrat wurde die Glucuronidierung durch Zugabe von 25 µl einer 20%igen Trichloressigsäure (TCA) abgestoppt. Die dadurch gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt, anschließend die Lösung mit 25 µl einer 1 N NaOH rückneutralisiert und ein 25 µl-Aliquot zur Analyse in die HPLC eingespritzt (s. 6.2.1). Die Identifizierung der Glucuronide sowie die Auswertung fand nach 6.2.5 statt.

6.2.4.2. COMT-Assay

Auch die Methylierung von Catecholen mittels COMT wurde mit verschiedenen biologischen Testsystemen durchgeführt (HLC, Zelllysate von V79-, MCF-7- bzw. HepG2-Zellen). Die Inkubationen fanden in einem Gesamtvolumen von 1 ml in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) sowie im linearen Bereich der COMT statt. Die gewünschte Menge an cytosolischem Protein (1 mg Protein/ml bzw. 5 - 10 x 10⁶ Zellen/ml) wurde mit Magnesiumchlorid (Endkonzentration: 4 mM) sowie der entsprechenden Menge an Substratlösung (2,5 - 100 µM; DMSO-Anteil im Ansatz: 1%) gemischt und bei 37°C 5 Min im Thermomixer vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von SAM (Endkonzentration: 0,5 mM) gestartet und weitere 10 - 90 Min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit Ethylacetat extrahiert (s. 6.2.4.4). Als Negativkontrolle diente die Methylierung ohne das Cosubstrat SAM. Die Identifizierung der gebildeten Methylierungsprodukte sowie die Auswertung der Experimente ist in 6.2.5 beschrieben.

6.2.4.3. Kombiniertes Glucuronidierungs- und COMT-Assay mit HepG2-Zelllysat

Um die mit HepG2-Zelllysat (50×10^6 Zellen/ml) gebildeten Glucuronide und Methylierungsprodukte der CEs parallel zu erfassen, wurde der Glucuronidierungsassay nach 6.2.4.1 durchgeführt, jedoch wurde die Reaktion nicht nur mit UDPGA (Endkonzentration: 4 mM), dem Cosubstrat für die Glucuronidierung, sondern auch mit SAM (Endkonzentration: 2,5 mM), dem Cosubstrat der Methylierung, gestartet. Die restliche Aufarbeitung erfolgte gemäß 6.2.4.1.

6.2.4.4. Extraktion mit Ethylacetat

Die Probelösungen der Glucuronidierungs- bzw. COMT-Assays wurden dreimal mit 0,5 ml Ethylacetat extrahiert. Danach erfolgte das Einengen der vereinigten Extrakte unter Vakuum bis zur Trockene, die Aufnahme des Rückstandes in 30 µl Methanol sowie die HPLC-Analyse mittels UV-Detektor (s. 6.2.1).

6.2.4.5. Kinetische Untersuchungen

Kinetische Untersuchungen wurden mit RNM, HLM, HLC sowie mit Zelllysat aus MCF-7-Zellen durchgeführt. Während mit RNM und HLM die Kinetiken von Glucuronidierungsreaktionen untersucht wurden, waren es mit HLC bzw. Zelllysat aus MCF-7-Zellen die Kinetiken von Methylierungen. Die Durchführung der Glucuronidierung sowie der Methylierung ist in 6.2.4.1 bzw. in 6.2.4.2 aufgezeigt. Die Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 6.3 zusammengefasst. Es wurde sichergestellt, dass die Untersuchungen im linearen Bereich der jeweils untersuchten Enzyme durchgeführt wurden.

Tabelle 6.3.: Inkubationsbedingungen bei den Bestimmungen der kinetischen Profile. S, Substratkonzentration; P., Protein; t, Inkubationsdauer; Z., Zellen.

Testsystem	Substrat	S	Proteingehalt		t
		(µM)	(mg P./ml)	($\times 10^6$ Z./ml)	(Min)
HLM	E2 & Metaboliten	5 - 150	0,25 - 0,5	–	10 - 30
RNM	E2	5 - 100	0,5	–	30
HLC	CEs	5 - 100	1	–	10 - 60
MCF-7	CEs	2,5 - 100	–	5	15 - 90

Um das kinetische Profil zu ermitteln, wurden die errechneten katalytischen Aktivitäten gegen die jeweils eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen. Außerdem wurde der Eadie-Hofstee-Plot zur Identifizierung der Kinetiken benutzt, bei der die errechnete katalytische Aktivität gegen den jeweiligen Quotienten aus katalytische Aktivität/Substratkonzentration aufgezeigt wurde.

Die untersuchten Kinetiken waren:

- Michaelis-Menten-Kinetik:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot S}{K_m + S}$$

- Hill-Kinetik:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot S^n}{K_{0,5}^n + S^n}$$

- Hemmkinetik:

$$v = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_m}{S} + \frac{S}{K_s}}$$

v : katalytische Aktivität (Reaktionsgeschwindigkeit)

v_{\max} : maximale Geschwindigkeit

S : Substratkonzentration

K_m ($K_{0,5}$): Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit

n : Hill-Koeffizient bzw. Grad der Sigmoidität der Kurve

K_s : Hemmkonstante

Die entsprechenden Kurven sowie die kinetischen Parameter wurden für jedes Substrat unter Verwendung der nichtlinearen Regressionsanalyse des Computerprogrammes OriginPro 6.0 (OriginLab Corporation, Northampton, Ma, USA) ermittelt. Bei der Hemmkinetik wurden v_{\max} und K_m nur mit den errechneten katalytischen Aktivitäten des noch linearen Kurventeils (bei niedrigen Substratkonzentrationen), unter Annahme einer Michaelis-Menten-Kinetik, mittels nichtlinearer Regressionsanalyse bestimmt. Daraus wurde dann K_s berechnet.

Für die Michaelis-Menten- bzw. die Hemmkinetik (6.1) sowie für die Hill-Kinetik (6.2) wurde die CL_{int} nach den Gleichungen

$$CL_{\text{int}} = \frac{v_{\max}}{K_m} \quad (6.1)$$

und

$$CL_{\text{int}} = \frac{v_{\text{max}}}{K_{0,5}} \cdot \frac{n - 1}{n \cdot (n - 1)^{\frac{1}{n}}} \quad (6.2)$$

berechnet.

6.2.5. Identifizierung von Glucuroniden und Methylierungsprodukten

Die Identifizierung der gebildeten Glucuronide fand zum einen durch den Vergleich der Retentionszeiten in der HPLC mit denen von Standardsubstanzen bzw. durch Chromatographie mit diesen statt (wenn vorhanden) und zum anderen durch Hydrolyse der Glucuronide mittels β -Glucuronidase Typ B-1 aus Rinderleber. Dazu wurde die Glucuronidierung wie angegeben (s. 6.2.4.1) durchgeführt, jedoch ohne Zugabe des β -Glucuronidase-Inhibitors Saccharinsäure-1,4-Lacton, und aufgearbeitet. Nach der Aufarbeitung wurde ein Aliquot der Probelösung zur Analyse der gebildeten Glucuronide direkt in die HPLC eingespritzt (s. 6.2.1). Ein weiteres Aliquot der Probelösung wurde mit 0,15 M Natriumacetat-Puffer (pH 5,0), der 5000 U der β -Glucuronidase enthielt, gemischt (Verhältnis Probelösung/Natriumacetat-Puffer 1:1) und für 16 h bei 37°C gespalten. Danach erfolgte die Extraktion mit Ethylacetat sowie die chromatographische Analyse der methanolischen Lösung wie in 6.2.4.4 beschrieben.

Bei den Methylierungsprodukten 2-MeO-E2, 2-MeO-E1, 4-MeO-E2 sowie 4-MeO-E1 erfolgte die Identifizierung in der HPLC ebenfalls durch den Vergleich der Retentionszeiten mit Retentionszeiten von Standardsubstanzen bzw. durch Chromatographie mit diesen. Dadurch konnte bei den Inkubationen mit 2-HO-E2 bzw. 2-HO-E1 der jeweils zweite gebildete Metabolitenpeak dem 2-HO-3-O-Me-E2 und 2-HO-3-O-Me-E1 zugeordnet werden, da bei diesen beiden Methylierungsprodukten keine Standardsubstanzen vorhanden waren.

Die Ausbeute an Glucuroniden bzw. Methylierungsprodukten und die katalytischen Aktivitäten wurden auf der Grundlage der erhaltenen HPLC-Chromatogramme über das Verhältnis der Peakflächen von Muttersubstanz und zugehörigem(n) Glucuronid(en) bzw. Methylierungsprodukt(en) berechnet. Dabei wurde für die Glucuronide/Methylierungsprodukte der Extinktionskoeffizient der Muttersubstanz angenommen. Eine Ausnahme stellte das E2-3-G dar, dessen Extinktionskoeffizient nur halb so groß ist wie der von E2, so dass die für das E2-3-G erhaltenen Peakflächen vor der Berechnung noch verdoppelt wurden. Die katalytischen Aktivitäten wurden bei Ver-

wendung von Mikrosomen als Enzymquelle in pmol/(Min x mg Protein) angegeben und beim Einsatz von Zelllysate in pmol/(Min x Zellzahl).

6.2.6. Allgemeine Zellkulturarbeiten

Vor der Benutzung der Lösungen in der Zellkultur wurden diese auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

6.2.6.1. Kultivieren und Passagieren der Zellen

Zum Passagieren wurde das Medium von den Zellkulturschalen (Ø 150 mm) abgesaugt und die Zellen mit jeweils 7 ml PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBS wurden 3 ml Trypsinlösung (0,25%) auf die V79- bzw. MCF-7-Zellen sowie 2 ml auf die HepG2-Zellen gegeben und gleichmäßig über die Zellkulturschalen verteilt. Bei V79- sowie MCF-7-Zellen wurde die Trypsinlösung nach 20 sec wieder abgesaugt, bei HepG2-Zellen blieb das Trypsin auf den Zellen. Jede Zellkulturschale wurde solange in den Brutschrank gestellt, bis sich die Zellen abkugelten (V79-/MCF-7-Zellen für 4 Min, HepG2-Zellen für 9 Min). Die von dem Schalenboden abgelösten Zellen wurden in 10 ml serumhaltigem Medium aufgenommen. Durch mehrmaliges Abspülen jeder Schale mit dem zugegebenen Medium wurden die noch an der Schale haftenden Zellen abgelöst, was auch zur Vereinzelung der Zellen führte. Die Zellzahl/ml wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Dabei wurde bei den V79- bzw. MCF-7-Zellen eine 1:10-Verdünnung eingesetzt, bei HepG2-Zellen eine 1:5-Verdünnung. Es wurden etwa 5×10^5 V79-Zellen und 1×10^6 MCF-7- bzw. HepG2-Zellen in 20 ml frischem Medium mit FKS ausgestreut. Alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

6.2.6.2. Auftauen und Einfrieren der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die gefrorenen Zellen nach dem Antauen bei 37°C in 10 ml serumhaltiges Medium überführt und bei 300 x g für 5 Min abzentrifugiert. Das überstehende Medium wurde abgesaugt und durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden darin resuspendiert und in eine Zellkulturschale (Ø 100 mm) überführt. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Beim Einfrieren wurde eine Zellsuspension aus 3×10^6 Zellen bei 4°C und 65 x g für 5 Min zentrifugiert, das überstehende Medium abgesaugt, die Zellen in 1,5 ml Einfriermedium, bestehend aus 90% FKS und 10% DMSO, resuspendiert und für 6 - 12 h bei -20°C eingefroren. Danach wurden die Zellen in weiteren 24 h auf -80°C abgekühlt, anschließend in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

6.2.6.3. Substanzinkubation von kultivierten Zellen

Um die verschiedenen Zelllinien mit Substanz zu inkubieren, wurde je nach Fragestellungen eine bestimmte Anzahl an Zellen auf Zellkulturschalen mit geeignetem Durchmesser (s. Tabelle 6.4) ausgestreut.

Tabelle 6.4.: Inkubationsbedingungen bei den verschiedenen Experimenten mit kultivierten Zellen. Ø, Durchmesser der verwendeten Zellkulturschalen; S, Substanzkonzentration; t, Inkubationsdauer; D, Daidzein; Ge, Genistein; Q, Quercetin; CEs, Catecholestrogene; L(Quercetin), mit Quercetin beladene Liposomen. ¹ Hier wurde die Substanzinkubation nach 24 h nicht aufgefrischt.

Zelllinie	Zellzahl (x 10 ⁶ Zellen/ml)	Ø (mm)	Substanz	S (µM)	DMSO (%)	t (h)
Induktion der UGTs mit Chrysin						
MCF-7	3	150	Chrysin	10	0,1	48; 72
HepG2	5	150	Chrysin	10	1	72
Inkubation mit Flavonoiden zur Prüfung ihres Einflusses auf die UGT-Aktivität						
HepG2	7	150	D; Ge	20	0,1	48
Inkubation mit Flavonoiden zur Prüfung ihres Einflusses auf die COMT-Aktivität						
MCF-7	1	100	D; Ge; Q	10; 20	0,1	48
	5	100	D; Ge; Q	10; 20	0,1	72
HepG2	1	100	D; Ge; Q	10; 20	0,1	48; 72
CEs-Coinkubationen/Zeitlicher Verlauf der Bildung von Methoxyderivaten der CEs						
MCF-7	2	60	CEs	2,5	0,2/0,1	1/1 - 7
HepG2	2	60	CEs	2,5	0,2/0,1	2/1 - 7
Nachweis von Glucuroniden im Medium inkubierter Zellen						
HepG2	2	60	4-HO-E1	2,5	0,1	1 - 6
AU mit induzierten MCF-7- bzw. HepG2-Zellen						
MCF-7	0,1	40	Aroclor 1254	25	0,1	48 ¹
HepG2	0,04	40	Aroclor 1254	50	1	72 ¹
Überprüfung der Aufnahme von L(Quercetin) in V79-Zellen						
V79	3	100	Quercetin	50	0,5	0,5 - 1,5
	3	100	L(Quercetin)	50	wässrig	0,5 - 1,5
Überprüfung der Wirkung des COMT-Hemmstoffes Ro 41-0960						
MCF-7	2	60	Ro 41-0960	1 - 10	0,1 (Ethanol)	1,5
			2-HO-E2	25	0,25	1

Nach dem Ausstreuen wurden die Zellen 24 h anwachsen gelassen. Daraufhin fand die Substanzinkubation statt, in dem das Medium abgesaugt und durch neues, serumhaltiges Medium, das die jeweilige(n) Substanz(en) enthielt, ersetzt wurde. Erfolgte die Inkubation länger als 24 h, wurde nach 24 h das Inkubationsmedium noch einmal durch neues, serumhaltiges Medium mit Substanz ausgetauscht (¹Ausnahmen: hier wurde die Substanzinkubation nicht aufgefrischt). Einen Überblick über die Inkubationsbedingungen bei den verschiedenen Experimenten zeigt Tabelle 6.4. Die weitere Vorgehensweise nach den Inkubationen ist in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

6.2.6.4. Herstellung von Zelllysats aus kultivierten Zellen

Bei der Herstellung des Zelllysates wurden die Zellen zuerst von den konfluent bewachsenen Schalen (\varnothing 150 mm) wie in 6.2.6.1 beschrieben abgelöst. Alle abgelösten Zellen einer Schale wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt (Volumen: 15 ml). Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 4°C und 1000 x g. Das überstehende Medium wurde abgesaugt, die abzentrifugierten Zellen in 3 ml kaltem PBS aufgenommen, gemischt und in einem neuen Zentrifugenröhrchen (Volumen: 50 ml) vereinigt. Anschließend wurde die Zellzahl/ml mit der Neubauerzählkammer bestimmt (s. 6.2.6.1). Das Volumen der Zellsuspension, welches der gewünschten Zellzahl (z.B. 5 bzw. 10×10^6 Zellen) entsprach, wurde berechnet und in 2 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Es folgte erneut eine Zentrifugation bei 4°C und 960 x g für 5 Min. Danach wurde das überstehende PBS abgesaugt und die abzentrifugierten Zellen in 50 μ l neuem, kaltem PBS suspendiert. Durch Einfrieren der gewonnenen Zellsuspension bei -80°C lysierten die Zellen.

6.2.6.5. Extraktion von Zellkulturmedium mit Ethylacetat

Zur Extraktion von Substanzen bzw. Metaboliten aus Zellkulturmedium wurde auf dieses Ethylacetat gegeben (Verhältnis: 1:1). Die Mischung wurde 45 sec bei höchster Stufe gevortext, 5 Min bei 4°C und 1500 x g zur Trennung der Phasen zentrifugiert und die organische Ethylacetatphase abgenommen. Das Ethylacetat wurde unter Vakuum entfernt, der Rückstand in 30 μ l Methanol aufgenommen und mittels HPLC und UV-Detektion analysiert (s. 6.2.1).

6.2.7. Bestimmung der COMT-Aktivität nach Flavonoidinkubation

Zur Untersuchung des Einflusses der Flavonoide Daidzein, Genistein und Quercetin auf die COMT-Aktivität wurden Zellen, wie in Tabelle 6.4 dargestellt, ausgestreut und inkubiert. Nach der Inkubation mit dem jeweiligen Flavonoid wurde das Inkubationsmedium abgesaugt, 10 ml neues, serumhaltiges Medium, das 2,5 μM 2-HO-E2 enthielt, auf die Zellen gegeben und für 1 h inkubiert. Dann wurde das Medium von den Zellen abgenommen und TMBPA als interner Standard zugefügt (Endkonzentration im Medium: 0,4 μM). Es folgte die Extraktion des Mediums mit Ethylacetat und die weitere Aufarbeitung wie bei 6.2.6.5 beschrieben. Die im HPLC-Chromatogramm erhaltenen Peakflächen der beiden Methylierungsprodukte des 2-HO-E2 wurden, nach der Berücksichtigung des Verlustes bei der Extraktion durch den internen Standard, summiert. Die mit den Isoflavon- bzw. Quercetininkubationen erhaltenen Summen wurden entweder auf diejenigen der DMSO-Kontrollen, die 100% gesetzt wurden, bezogen oder es wurde, bei der Berücksichtigung der Zellzahl, das Flächenäquivalent pro Zelle berechnet und mit dem der DMSO-Kontrolle verglichen.

6.2.8. Nachweis von Glucuroniden im Medium von mit CEs inkubierten HepG2-Zellen

Um die mit Zelllysate aus kultivierten HepG2-Zellen gebildeten CE-Glucuronide auch im Inkubationsmedium (DMEM/F12) dieser Zellen nachweisen zu können, wurden verschiedene Methoden auf ihre Eignung untersucht.

6.2.8.1. Saure Extraktion mit Ethylacetat sowie Spaltung der Glucuronide mit β -Glucuronidase Typ B-1 aus Rinderleber

Beide Methoden wurden anhand von einem CE, 4-HO-E1, getestet. Die HepG2-Zellen wurden wie in Tabelle 6.4 beschrieben ausgestreut und mit 4-HO-E1 inkubiert. Für die saure Extraktion wurde die Methode von Matern et al. (1994) modifiziert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Inkubationsmedium abgenommen und mit dem gleichen Volumen 0,7 M Glycin-HCl-Puffer (pH 1,2) versetzt. Es folgte die Extraktion mit Ethylacetat (s. 6.2.6.5). Zur Durchführung der Spaltung mittels β -Glucuronidase Typ B-1 aus Rinderleber wurde ebenfalls das Inkubationsmedium abgenommen und TMBPA (Endkonzentration: 0,4 μM) als interner Standard zugefügt. Die Hälfte des Mediums (2,5 ml) wurde mit Ethylacetat extrahiert (s.

6.2.6.5) und chromatographisch analysiert (s. 6.2.1). Mit den restlichen 2,5 ml Inkubationsmedium erfolgte die Glucuronidspaltung für 3 - 16 h mit β -Glucuronidase nach 6.2.5. Danach wurde erneut mit Ethylacetat extrahiert (s. 6.2.6.5).

6.2.8.2. Aussalzen der Glucuronide mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Das Aussalzen von Glucuroniden aus einer biologischen Matrix wurde mit dem Modells substrat TFMU etabliert. Dazu wurde TFMU (100 μM) für 10 Min mit RLM (0,25 mg/ml) von männlichen SD Ratten glucuronidiert (s. 6.2.4.1). Nach Abstoppen der Reaktion mit TCA und Rückneutralisation mit NaOH wurde ein 25 μl -Aliquot der Probelösung direkt in die HPLC eingespritzt (s. 6.2.1), um die Glucuronidbildung zu überprüfen. Weitere 25 μl wurden mit 5 ml DMEM/F12-Medium mit (10%) bzw. ohne FKS gemischt, 2,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurden dazu gegeben, was einer gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung entsprach. Diese Mischung wurde für 10 Min auf Eis stehen gelassen und nach 6.2.6.5 weiter aufgearbeitet.

6.2.9. Untersuchung der Stabilität von Catecholen in Zellkulturmedium bei Raumtemperatur

Die Stabilität der CEs 2-HO-E2, 2-HO-E1, 4-HO-E2 bzw. 4-HO-E1 sowie von Quercetin wurde in DMEM/F12-Zellkulturmedium ohne und mit 10% FKS bei Raumtemperatur sowie in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) getestet. Dazu wurden 20 ml Medium oder Puffer zusammen mit einem CE bzw. mit Quercetin (2,5 μM) bei Raumtemperatur inkubiert. Der DMSO-Anteil war 0,1%. Nach Ablauf der Inkubationszeit (0 - 24 h) wurden jeweils 2,5 ml Testlösung abgenommen und TMBPA (Endkonzentration: 0,4 μM) als interner Standard zugegeben, um Verluste bei der folgenden Extraktion mit Ethylacetat (s. 6.2.6.5) zu erfassen. Aus den erhaltenen Peakflächen bei der HPLC-Analyse (s. 6.2.1) wurde die Menge an Catecholen in der Testlösung mittels Ein-Punkt-Kalibrierung (s. A.1) und unter Berücksichtigung der Extraktionsverluste bestimmt. Dieser Anteil wurde auf die berechnete theoretisch enthaltene Stoffmenge, die 100% gesetzt wurde, bezogen. Für jedes Catechol und für jeden Zeitpunkt wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und daraus MW und SD berechnet.

6.2.10. AU mit kultivierten Zellen

6.2.10.1. Methode A

Die AU stellt ein Testsystem zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen in kultivierten Zellen dar und wurde nach Hartwig et al. (1993) durchgeführt. Nach der Entwindung

der DNA im Alkalischen und der Fraktionierung von einzel- bzw. doppelsträngiger DNA durch eine HA-Chromatographie kann aus dem Verhältnis der detektierten Menge an einzel- bzw. doppelsträngiger DNA die Anzahl an DNA-Strangbrüchen ermittelt werden.

Je nach verwendeter Zelllinie wurden 1×10^5 (V79-Zellen) bzw. $1,4 \times 10^5$ Zellen (MCF-7- bzw. HepG2-Zellen) ausgestreut (\varnothing der Zellkulturschalen: 40 mm). Aufgrund der unterschiedlichen Verdopplungszeiten der untersuchten Zelllinien (V79-Zellen: 12 h, MCF-7- bzw. HepG2-Zellen: 24 h), wurden die V79-Zellen nach 24 h mit Substanz inkubiert, die MCF-7- bzw. HepG2-Zellen erst nach 48 h. Für die Substanzinkubation wurde das serumhaltige Medium abgesaugt und durch 2 ml neues Medium, ohne FKS, ersetzt. Das Medium enthielt die zu testende Substanz in Konzentrationen zwischen 5 und 50 μM . Getestet wurden die CEs sowie Quercetin (50 μM) bzw. L(Quercetin) (25 bzw. 50 μM , s. 6.2.12). Als Positivkontrollen dienten 50 μM t-BuOOH sowie Menadion (10 - 20 μM). Die CEs, das Quercetin sowie das Menadion wurden in DMSO gelöst eingesetzt (DMSO-Anteil im Medium: 0,5%). L(Quercetin) bzw. t-BuOOH wurden in Form von wässrigen Lösungen verwendet. Die t-BuOOH-Lösung wurde dabei immer frisch und auf Eis hergestellt. In einem Experiment wurden pro zu prüfender Substanzkonzentration eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Auch Kontrollschalen mit bzw. ohne DMSO wurden mitgeführt. Zusätzlich wurde eine Schale angesetzt, die nicht inkubiert wurde, um nach dem Experiment die Zellzahl der Schale mittels Neubauerzählkammer für die später folgende HA-Chromatographie zu ermitteln. Die Inkubationszeiten richteten sich, ebenso wie die Anwachsphasen, nach dem Verdopplungszyklus der Zellen. Deshalb wurde bei V79-Zellen nur halb so lange (1,5 h) wie bei MCF-7- und HepG2-Zellen (3 h) inkubiert. Bei Inkubationen von V79-Zellen mit Quercetin bzw. L(Quercetin) betrug die Inkubationszeit zusätzlich noch 5 h. Die folgenden Schritte wurden auf Eis in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, um zusätzliche DNA-Schäden durch Licht zu vermeiden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Inkubationsmedium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS versetzt. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Schalen auf Eis gelagert. In einminütiger Staffelung wurde das PBS von den Zellkulturschalen abgesaugt und 1,5 ml frische alkalische Lösung (pH 12,3) in die Schalen pipettiert. Die AU erfolgte in absoluter Dunkelheit für 30 Min bei Raumtemperatur. Danach wurde die alkalische Lösung mit einer definierten Menge an 0,1 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,8 neutralisiert. Die dafür benötigte Menge an Salzsäure wurde mittels einer pH-Elektrode in einem Vorversuch bestimmt. Der gesamte Inhalt der Zell-

kulturschalen wurde anschließend in ein Glasröhrchen überführt und 15 sec mit 40 Watt, unter Eiskühlung, mittels einer Ultraschallspitze sonifiziert, so dass nun ein Gemisch aus einzel- und doppelsträngiger DNA vorlag. Nach Zugabe von 12,4 µl Natrium-Dodecylsulfat (SDS, Endkonzentration: 0,05%) konnten die Röhrchen bei -20°C bis zur Trennung der erhaltenen DNA-Einzel- bzw. Doppelstränge mittels HA-Chromatographie aufbewahrt werden.

HA-Chromatographie und Quantifizierung von einzel- bzw. doppelsträngiger DNA

Für die Durchführung der HA-Chromatographie wurden die benötigten Puffer und Proben auf 60°C temperiert. Das HA (0,1 g/ml) wurde in 0,01 M Natriumphosphat-Puffer für 30 Min bei 60°C quellen gelassen. Anschließend wurde je 1 ml des gequollenen HA in eine Säule, deren Boden bereits mit einem Glasfaserfilter bedeckt war, überführt. Auf das HA wurde ein weiterer Glasfaserfilter gesetzt. Als Säulen dienten 2 ml Einwegspritzen (aus Kunststoff, ohne Stempel). Die so vorbereiteten Säulen wurden mit 1,5 ml 0,5 M Kaliumphosphat-Puffer gewaschen, mit 1,5 ml 0,01 M Natriumphosphat-Puffer äquilibriert und die Proben aufgetragen. Auf die Säulen sollte der DNA-Gehalt von 2×10^5 - 5×10^5 Zellen aufgebracht werden. Gemäß der ermittelten Zellzahl wurde deshalb das Gesamtvolumen der Probe auf die Säulen überführt oder ein 5×10^5 Zellen entsprechendes Aliquot. Nach dem Auftragen der Proben wurde mit 2,5 ml 0,01 M Natriumphosphat-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Probenbestandteile und Verunreinigungen zu entfernen. Die Elution der einzelsträngigen DNA erfolgte mit 1,5 ml 0,15 M Kaliumphosphat-Puffer, die darauffolgende Elution der doppelsträngigen DNA mit 1,5 ml 0,35 M Kaliumphosphat-Puffer. Die beiden Fraktionen wurden jeweils in 24-Well-Mikrotiterplatten aufgefangen. In jeder Platte wurde zusätzlich noch ein Pufferwert (0,15 bzw. 0,35 M Kaliumphosphat-Puffer) mitgeführt. Zur Detektion der einzel- bzw. doppelsträngigen DNA in den Wells wurde pro Well 3,85 µl Höchst-Farbstoff 33258 pipettiert (Endkonzentration: 0,77 µM), gemischt und für 25 Min im Dunkeln stehen gelassen. Der Farbstoff fluoresziert, sobald er an die DNA bindet. Die Fluoreszenzintensitäten wurden im Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Emissionswellenlänge von 465 nm nach einer Anregung bei 360 nm gemessen.

Berechnung der Anzahl an induzierten DNA-Strangbrüchen

Berechnung des Anteils an doppelsträngiger (ds) DNA:

$$\text{ds DNA} = \frac{\text{rel. Fluoreszenz (Doppelstrang)}}{\text{rel. Fluoreszenz (Doppelstrang)} + 2,1 \cdot \text{rel. Fluoreszenz (Einzelstrang)}}$$

relative (rel.) Fluoreszenz: Fluoreszenz der Probe – Fluoreszenz des Pufferblindwertes

Der Korrekturfaktor 2,1 berücksichtigt, dass der verwendete Höchst-Farbstoff stärker an doppelsträngige DNA bindet [Hartwig et al. (1993)].

Berechnung der DNA-Strangbrüche pro Zelle:

$$\text{DNA-Strangbrüche/Zelle} = -\ln \frac{\text{ds DNA (Probe)}}{\text{ds DNA (Mittelwert der Kontrollen)}} \cdot 10000$$

Der Korrekturfaktor von 10000 wurde über eine Kalibrierung mit Röntgenstrahlung ermittelt.

AU mit dem COMT-Hemmstoff Ro 41-0960

Wurde bei Inkubationen mit 2-HO-E2 in MCF-7-Zellen noch zusätzlich der COMT-Hemmstoff Ro 41-0960 eingesetzt, erfolgte zuerst eine 30-minütige Vorinkubation mit 1 ml Medium ohne FKS, das den Inhibitor (3 - 10 µM) enthielt. Nach diesen 30 Min wurde in jede Schale (Ø der Zellkulturschalen: 40 mm) zusätzlich 1 ml Medium ohne FKS, aber mit 2-HO-E2 (Endkonzentration: 25 µM) pipettiert und weitere 3 h inkubiert. Danach folgte die AU der Beschreibung von Methode A.

AU mit induzierten MCF-7- bzw. HepG2-Zellen

Die Induktion von CYPs in MCF-7- bzw. HepG2-Zellen mittels Aroclor 1254 wurde durchgeführt, um endogen CEs aus E2 entstehen zu lassen. In Tabelle 6.4 sind die verwendeten Inkubationsbedingungen aufgezeigt. Da die beiden Zelllinien im MTT-Test (Durchführung s. 6.2.13) unterschiedlich auf Aroclor 1254 reagierten, wurden die HepG2-Zellen für 72 h mit 50 µM Aroclor 1254 inkubiert, die MCF-7-Zellen jedoch nur 48 h mit 25 µM. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit wurde das Inkubationsmedium abgenommen und durch 2 ml serumfreies Medium mit E2 in Konzentrationen zwischen 5 und 50 µM ersetzt. E2 wurde in DMSO gelöst, dessen Anteil

im Medium bei 0,5% lag. Die Inkubationszeit mit E2 betrug in beiden Zelllinien 3 h, der weitere Verlauf ist in Methode A beschrieben.

6.2.10.2. Methode B

Durch die Kombination der AU mit dem Einsatz des bakteriellen DNA-Reparatur-enzym Fpg ist neben DNA-Strangbrüchen auch der Nachweis von oxidativen DNA-Schäden möglich. Das Fpg wandelt verschiedene oxidative Schäden in DNA-Strangbrüche um (s. 1.1.4). Das Ausmaß der entstandenen Strangbrüche wurde schließlich mittels der AU nach Hartwig et al. (1996) und Tchou et al. (1994) bestimmt.

Diese Methode wurde nur in V79-Zellen durchgeführt. Das Ausstreuen und Inkubieren wurden schon in 6.2.10.1 beschrieben. Inkubiert wurde mit den CEs (50 µM) sowie mit Quercetin (50 µM). Als Positivkontrolle diente Menadion (10 - 20 µM). Der DMSO-Anteil im Medium betrug 0,5% und die Inkubationszeit 1,5 h. Die Methode B unterscheidet sich von Methode A in der Behandlung der Zellen im abgedunkelten Raum nach der Inkubation. Das nach der Inkubation aufgegebene eiskalte PBS (1,5 ml) wurde abgesaugt und durch 0,5 ml Lysepuffer ersetzt, welcher nach 5 Min wieder entfernt wurde. Es folgte eine zweiminütige Inkubation mit 0,5 ml Salzlösung und eine achtminütige Nachinkubation auf Eis. Bei diesem Schritt wurden noch vorhandene Histone von der DNA abgelöst, wodurch die Zugänglichkeit des Fpg an die oxidativen DNA-Schäden gewährleistet wurde. Nun wurde die Hälfte der Proben zur Bestimmung der oxidativen Schäden mit 0,76 ml einer 1:1000-Verdünnung des Fpg-Enzyms in Fpg-Puffer versetzt, die andere Hälfte nur mit Fpg-Puffer ohne Fpg-Enzym, um die DNA-Strangbrüche ohne oxidative Schäden zu erhalten. Von jeder eingesetzten Konzentration wurde pro Experiment sowohl für die Bestimmung der oxidativen Schäden als auch für die Ermittlung der DNA-Strangbrüche eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Zellkulturschalen wurden exakt 30 Min im Trockenschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte die AU der DNA durch Zugabe von je 0,775 ml einer alkalischen Lösung im Dunkeln bei Raumtemperatur. Der pH-Wert nach Zusetzen der alkalischen Lösung betrug 12,3, die Entwindungszeit 30 Min. Die restlichen Schritte folgten wie bei 6.2.10.1 ausgeführt.

Berechnung der Anzahl an induzierten DNA-Schäden

Berechnung der DNA-Strangbrüche pro Zelle:

$$\text{Strangbrüche/Zelle} = -\ln \frac{\text{ds DNA (Probe)}}{\text{ds DNA (Mittelwert der Kontrollen ohne Fpg)}} \cdot 16666$$

Die Berechnung des Anteils an doppelsträngiger (ds) DNA erfolgte wie bei Methode A. Der Korrekturfaktor von 16666 wurde über eine Kalibrierung mit Röntgenstrahlung ermittelt [Hartwig et al. (1996)].

Berechnung der gesamten DNA-Schäden pro Zelle, zusammengesetzt aus den detektierten DNA-Strangbrüchen und oxidativen Schäden:

$$\text{DNA-Schäden/Zelle} = -\ln \frac{\text{ds DNA (Probe mit Fpg)}}{\text{ds DNA (Mittelwert der Kontrollen mit Fpg)}} \cdot 16666$$

6.2.11. AU von Kalbsthymus-DNA

Um DNA-Strangbrüche an reiner Kalbsthymus-DNA (und somit unabhängig von zellulären Einflüssen) nachweisen zu können, wurde die AU (Methode A, s. 6.2.10.1) angepasst.

Es wurde eine Kalbsthymus-DNA-Lösung (0,33 µg/µl) in Wasser eingesetzt. 1 ml dieser Lösung (330 µg DNA) wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. In diese Lösung wurde die zu untersuchende Substanz in entsprechender Konzentration zugegeben. Die eingesetzten Substanzen waren die Positivkontrollen H₂O₂ (0,5 mM - 2 M), Menadion (2,5 - 20 µM) und t-BuOOH (50 µM - 1 mM) sowie die CEs (50 µM). Alle Substanzen, mit Ausnahme von t-BuOOH und H₂O₂ (hier wurden wässrige Lösungen eingesetzt), wurden in DMSO (Anteil im Ansatz: 1%) gelöst verwendet. Je nach Versuch enthielt der Ansatz noch 25 bzw. 50 µM CuCl₂ (CuCl₂ wurde in PBS gelöst) oder eine Kombination aus CuCl₂ (25 µM) und 100 µM NADH + H⁺. Als Negativkontrollen wurden sowohl Ansätze mitgeführt ohne Substanz, CuCl₂ und NADH + H⁺ als auch Ansätze ohne Substanz, aber mit CuCl₂ bzw. mit CuCl₂ und NADH + H⁺. So konnten DNA-Strangbrüche durch den Zusatz von CuCl₂ bzw. CuCl₂ und NADH + H⁺ ausgeschlossen werden. Die Versuchsansätze wurden dann im Dunkeln bei 37°C im Thermomixer für 1 bzw. 2 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von Katalase (100 U/ml) abgestoppt. Alle weiteren Schritte wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Die Reaktionsgefäße wurden für 10 Min auf Eis gestellt. Danach wurde jede Minute soviel Probelösung aus dem 2 ml Reaktionsgefäß in eine Zellkulturschale (Ø 40 mm) pipettiert, dass die enthaltene DNA-Menge pro Zellkulturschale 100 µg betrug. So konnte aus einem Reaktionsansatz im 2 ml Reaktionsgefäß bei der folgenden AU eine Dreifachbestimmung für jede eingesetzte Substanzkonzentration durchgeführt werden. Sofort nachdem die entsprechende Menge des Reaktionsansatzes in die jeweilige Zellkulturschale überführt wurde, wurden

1,5 ml einer alkalischen Lösung, pH 11,48, auf die Proben in den Schalen pipettiert. Das weitere Vorgehen wurde bereits in 6.2.10.1 beschrieben.

Bei der HA-Chromatographie musste darauf geachtet werden, dass nicht die komplette DNA-Probe auf eine Säule gegeben wurde, da der DNA-Gehalt in diesen Ansätzen deutlich höher war als der bei Methode A bzw. B vorliegende DNA-Gehalt von kultivierten Zellen. Es wurde immer nur ein Aliquot auf die HA-Säulen gegeben, das einem DNA-Gehalt von 5 µg entsprach.

Berechnung der Anzahl an induzierten DNA-Strangbrüchen

$$\text{DNA-Strangbrüche} = 100\% - \left(\frac{\text{ds DNA (Probe)}}{\text{ds DNA (Mittelwert der Kontrollen)}} \cdot 100\% \right)$$

Die Berechnung des Anteils an doppelsträngiger (ds) DNA erfolgte wie bei Methode A (s. 6.2.10.1).

6.2.12. Untersuchungen mit Liposomen

Durch die Verpackung von Catecholen in Liposomen sollte ihr Gehalt in Zellen und in Folge dessen die Induktion von DNA-Strangbrüchen erhöht werden. Dazu musste zuerst die Herstellung von Liposomen etabliert werden. Es wurden negativ geladene Liposomen hergestellt, da dadurch bei der Durchführung weniger MLVs und mehr kleinere, unilamellare Strukturen gebildet werden (s. auch 1.1.5) [Lasic (1995)].

6.2.12.1. Herstellung von Liposomen

Die Herstellung der Liposomen fand in Anlehnung an Miura et al. (2000b) statt. Ein Liposomenkit (Sigma/Aldrich), das aus Phosphatidylcholin (63 µmol), Stearylamin (18 µmol) und Cholesterol (9 µmol) bestand, wurde in 6 ml Chloroform gelöst. Bei der Herstellung von L(Quercetin), wurde zu dem in Chloroform gelösten Liposomenkit eine ethanolische Quercetinlösung, die 30 µmol Quercetin enthielt, pipettiert. Es folgte das Abdampfen des Chloroforms (bei Liposomen ohne Substanz) bzw. des Chloroform/Ethanol-Gemisches (bei Liposomen mit Quercetin) in einem 25 ml Rundkolben bei 40°C und 280 mbar. Nun wurde der Rückstand im Rundkolben für 5 Min unter den Stickstoffstrom gestellt, um den Luftsauerstoff zu verdrängen und dadurch die Lipidperoxidation zu vermindern. Es wurden 6 ml Kaliumphosphat-Puffer (pH

7, 4), der 0,15 M NaCl enthielt, in den Rundkolben pipettiert und wieder kurz unter den Stickstoffstrom gehalten. Daraufhin wurde für 10 Min bei Stufe 6 gevortext und die Suspension zu je 1 ml aliquotiert. Um die gebildeten Liposomen weiter zu verkleinern, damit sie von Zellen aufgenommen werden können, wurde jedes Aliquot auf Eis mit der Ultraschallspitze behandelt:

- 10 Min/50 Watt
- 5 Min Pause auf Eis
- 10 Min/74 Watt
- 5 Min Pause auf Eis
- 5 Min/50 Watt

Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Aliquots noch einmal kurz unter den Stickstoffstrom gestellt und anschließend bei 4°C bis zu ihrem Einsatz aufbewahrt.

6.2.12.2. Überprüfung der Aufnahme von L(Quercetin) in V79-Zellen

Die genauen Inkubationsbedingungen sind Tabelle 6.4 zu entnehmen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Inkubationsmedium (10 ml) abgenommen und 5 ml davon mit TMBPA als interner Standard (Endkonzentration: 2 µM) versetzt. Es folgte die Extraktion mit Ethylacetat (s. 6.2.6.5) und die HPLC-Analyse (s. 6.2.1). Die inkubierten V79-Zellen wurden wie in 6.2.6.1 erläutert von den Schalen abgelöst und in 7 ml PBS aufgenommen. Daraufhin wurde die Zellsuspension zentrifugiert (3000 x g, 12°C, 5 Min). Das überstehende PBS wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in 0,2 ml PBS resuspendiert und bei -80°C über Nacht eingefroren, um die Zellen zu lysieren. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension mit TMBPA (Endkonzentration: 50 µM) versetzt. Es folgte eine Sonifikation des Zelllysates mit der Ultraschallspitze für 15 sec bei 40 Watt. Zu der so vorbereiteten Zellsuspension wurden 0,5 ml Folchreagenz (Chloroform : Methanol = 2 : 1) pipettiert. Die Mischung wurde gevortext (45 sec, höchste Stufe) und anschließend wie bereits beschrieben zentrifugiert. Die Chloroformphase (untere Phase) wurde vorsichtig abpipettiert. Es folgte eine weitere Extraktion des Zelllysates mit 0,5 ml Folchreagenz, erneute Zentrifugation, die Vereinigung der Chloroformphasen sowie das Abdampfen des Chloroforms unter Vakuum bis zur Trockene. Zur chromatographischen Analyse (s. 6.2.1) wurde

der Rückstand in 30 μl Methanol aufgenommen. Der Gehalt an Quercetin in diesen Proben wurde anhand einer Einpunkt-Kalibrierung über die im HPLC-Chromatogramm erhaltenen Peakflächen berechnet (s. A.1). Ebenso wurde die Menge an Methylierungsprodukten des Quercetins bestimmt, wobei für die Methylierungsprodukte der gleiche Extinktionskoeffizient wie für die Muttersubstanz angenommen wurde. Die Identifizierung der Methylierungsprodukte des Quercetins erfolgte durch Vergleich der erhaltenen Retentionszeiten mit den Retentionszeiten, die bei einem COMT-Assay (s. 6.2.4.2) mit Quercetin als Substrat (50 μM) und Lebercytosol einer männlichen SD Ratte den Methylierungsprodukten zugeordnet werden konnten.

6.2.13. MTT-Test

Der MTT-Test beruht auf der zellulären Reduktion des MTT zum MTT-Formazan (Abbildung 6.1), das bei 570 nm sein Absorptionsmaximum besitzt. Das gelbe MTT wird durch Endozytose von den Zellen aufgenommen, und je nach Zelltyp erfolgt die Reduktion zu dem blauen Formazan in den Mitochondrien, Lysosomen oder im Cytosol [Liu et al. (1997); Takahashi et al. (2002)]. Diese Reduktion des MTT korreliert mit dem Redox-Status einer Zellpopulation und ist damit ein Viabilitätsparameter.

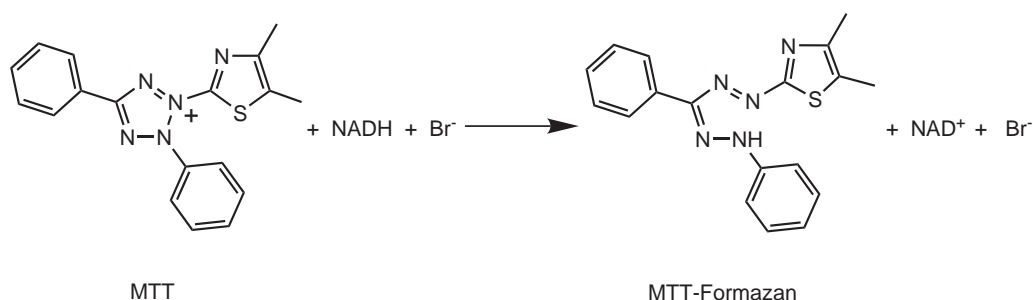


Abbildung 6.1.: Zelluläre Reduktion von MTT (gelb) zum MTT-Formazan (blau).

6.2.13.1. Bestimmung der Cytotoxizität von Aroclor 1254

Zur Messung der Viabilität von MCF-7- bzw. HepG2-Zellen bei Inkubationen mit dem CYP-Induktor Aroclor 1254 wurden in einer 96-Well-Platte pro Well 3 x 10⁴ MCF-7-Zellen bzw. 2 x 10⁴ HepG2-Zellen in 0,2 ml serumhaltigem Medium ausgestreut. Zunächst wurden diese Zellen für 24 h anwachsen gelassen, es folgte die Inkubation mit Aroclor 1254 im Konzentrationsbereich von 0 - 200 μM in 0,2 ml serumhaltigem Medium, wobei immer 8 Wells mit der gleichen Substanzkonzentration inku-

biert wurden. Die DMSO-Konzentrationen sowie die Inkubationszeiten zeigt Tabelle 6.4 (AU mit induzierten MCF-7- bzw. HepG2-Zellen). Die Kontrollzellen wurden nur mit dem entsprechenden Anteil DMSO inkubiert. Zwei Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit wurden 20 µl MTT-Lösung in jedes Well pipettiert, am Ende der gesamten Inkubationszeit die Inkubationslösung vorsichtig abgesaugt und jedes Well mit 0,1 ml Lysepuffer versetzt. Die Platte wurde 5 Min bei Raumtemperatur stehen gelassen, im Mikrotiterplattenlesegerät 5 Min geschüttelt und die Extinktion des gebildeten MTT-Formazans bei 570 nm gemessen. Nach Abzug des Reagenzienblindwertes wurden die Extinktionen auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen.

6.2.13.2. Bestimmung der Cytotoxizität des COMT-Inhibitors Ro 41-0960

Um die Cytotoxizität des COMT-Hemmstoffes Ro 41-0960 in MCF-7-Zellen zu testen, wurde der beschriebene MTT-Assay abgewandelt. Nach der Anwuchsphase der Zellen wurde das serumhaltige Medium abgesaugt und durch 0,1 ml neues Medium ohne FKS ersetzt. In diesem Medium war der COMT-Hemmstoff in Konzentrationen zwischen 0 und 200 µM enthalten. Das Lösungsmittel des Hemmstoffes war Ethanol, so dass der Anteil an Ethanol pro Well bei 0,1% lag. Nach 30 Min wurden pro Well weitere 0,1 ml Medium ohne FKS dazu pipettiert, die das Lösungsmittel der CEs, DMSO, in einer Konzentration von 0,5% enthielten (Endkonzentration von Ethanol/DMSO/COMT-Hemmstoff in 2 ml Medium: 0,05%/0,25%/0 - 100 µM). Es folgte eine weitere Inkubation von 3 h. Der nun folgende Ablauf entsprach dem bereits dargestellten (s. 6.2.13.1).

6.2.14. Überprüfung der 2-HO-E2-Methylierung in MCF-7-Zellen beim Einsatz des COMT-Inhibitors Ro 41-0960

Die Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 6.4 gezeigt. Nach der Anwuchszeit wurde das serumhaltige Medium abgesaugt und 2,5 ml neues Medium ohne FKS, aber mit dem COMT-Hemmstoff, auf die Zellen gegeben. Nun wurde 30 Min mit diesem Hemmstoff inkubiert. Dann wurden in jede Zellkulturschale weitere 2,5 ml Medium ohne FKS, jedoch mit dem CE 2-HO-E2 (Endkonzentration: 25 µM) dazu pipettiert. Zum Vergleich wurden Kontrollschalen angesetzt, die nur mit dem Lösungsmittel des COMT-Hemmstoffes, Ethanol (Endkonzentration 0,05%), und 2-HO-E2 inkubiert wurden. Die Inkubationszeit nach Zugabe von 2-HO-E2 betrug 1 h. Danach wurde das Medium abgenommen und mit Ethylacetat (s. 6.2.4.4) extrahiert. Die weitere Auf-

arbeitung sowie die Auswertung folgte der Beschreibung in 6.2.12.2. Die berechneten Methylierungsumsätze in Anwesenheit des COMT-Hemmstoffes wurden mit denen ohne Hemmstoff verglichen.

7. Literaturverzeichnis

- Adjei, A. A. und Weinshilboum, R. M., 2002. Catecholestrogen sulfation: possible role in carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Comm*, 292(2), 402–408.
- Aherne, S. A. und O'Brien, N. M., 2000a. Lack of effect of the flavonoids, myricetin, quercetin, and rutin, on repair of H₂O₂-induced DNA single-strand breaks in Caco-2, HepG2, and V79 cells. *Nutr Cancer*, 38(1), 106–115.
- Aherne, S. A. und O'Brien, N. M., 2000b. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radic Biol Med*, 29(6), 507–514.
- Ali, S. und Coombes, R., 2000. Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. *Mammary Gland Biol Neoplasia*, 5(3), 271–281.
- Alkharfy, K. M. und Frye, R. F., 2002. Sensitive liquid chromatographic method using fluorescence detection for the determination of estradiol 3- and 17-glucuronides in rat and human liver microsomal incubations: formation kinetics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 774(1), 33–38.
- Allred, C. D., Allred, K. F., Ju, Y. H., Virant, S. M. und Helferich, W. G., 2001. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Res*, 61(13), 5045–5050.
- Appelt, L. C. und Reicks, M. M., 1999. Soy induces phase II enzymes but does not inhibit dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis in female rats. *J Nutr*, 129(10), 1820–1826.
- Ball, P. und Knuppen, R., 1990. Formation, metabolism, and physiologic importance of catecholestrogens. *Am J Obstet Gynecol*, 163(6 Pt 2), 2163–2170.
- Baranczewski, P., Kallin, A., Andersson, A., Hagigi, S., Aberg, M., Postlind, H. und Mankowitz, L., 2004. Development of an assay using 4-trifluoromethylumbelliferyl as a marker substrate for assessment of drug-drug interactions to multiple isoforms of UDP-glucuronosyltransferases. *Assay Drug Dev Technol*, 2(4), 345–352.
- Bayer, T., Colnot, T. und Dekant, W., 2001. Disposition and biotransformation of the estrogenic isoflavone daidzein in rats. *Toxicol Sci*, 62(2), 205–211.
- Belous, A. R., Hachey, D. L., Dawling, S., Roodi, N. und Parl, F. F., 2007. Cytochrome P 450 1B1-mediated estrogen metabolism results in estrogen-deoxyribonucleoside adduct formation. *Cancer Res*, 67(2), 812–817.

- Bernstein, L. und Ross, R. K., 1993. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev*, 15(1), 48–65.
- Bianco, N. R., Chaplin, L. J. und Montano, M. M., 2005. Differential induction of quinone reductase by phytoestrogens and protection against oestrogen-induced DNA damage. *Biochem J*, 385(1), 279–287.
- Bolton, J. L., Pisha, E., Zhang, F. und Qiu, S., 1998. Role of quinoids in estrogen carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*, 11(10), 1113–1127.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248–254.
- Bruni, S. und Chang, T. M. S., 1999. Kinetic studies of hepatocyte UDP-glucuronosyltransferase: evidence of an allosteric enzyme. *Artif Cells, Blood Substitutes, Immobilization Biotechnol*, 27(4), 343–350.
- Burchell, B. und Coughtrie, M. W. H., 1989. UDP-glucuronosyltransferases. *Pharmacol Ther*, 43(2), 261–289.
- Cavalieri, E. L., Chakravarti, D., Guttenplan, J., Hart, E., Ingle, J., Jankowiak, R., Muti, P., Rogan, E. G., Russo, J., Santen, R. und Sutter, T., 2006. Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention. *Biochim Biophys Acta*, 1766(1), 63–78.
- Cavalieri, E. L., Devanesan, P. D., Bosland, M. C., Badawi, A. F. und Rogan, E. G., 2002. Catechol estrogen metabolites and conjugates in different regions of the prostate of Noble rats treated with 4-hydroxyestradiol: implications for estrogen-induced initiation of prostate cancer. *Carcinogenesis*, 23(2), 329–333.
- Cavalieri, E. L., Frenkel, K., Liehr, J. G., Rogan, E. G. und Roy, D., 2000. Estrogens as endogenous genotoxic agents—DNA adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst Monogr*, (27), 75–93.
- Cavalieri, E. L., Kumar, S., Todorovic, R., Higginbotham, S. M., Badawi, A. F. und Rogan, E. G., 2001. Imbalance of estrogen homeostasis in kidney and liver of hamsters treated with estradiol: implications for estrogen-induced initiation of renal tumors. *Chem Res Toxicol*, 14(8), 1041–1050.
- Cavalieri, E. L. und Rogan, E. G., 2006. Catechol quinones of estrogens in the initiation of breast, prostate, and other human cancers. Keynote lecture. *Ann N Y Acad Sci*, 1089(Estrogens and human diseases), 286–301.
- Cavalieri, E. L., Stack, D. E., Devanesan, P. D., Todorovic, R., Dwivedy, I., Higginbotham, S. M., Johansson, S. L., Patil, K. D., Gross, M. L., Gooden, J. K., Ramanathan, R., Cerny, R. L. und Rogan, E. G., 1997. Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(20), 10937–10942.

- Chen, J., Lin, H. und Hu, M., 2005a. Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavone analogs in the human intestinal Caco-2 model. *Cancer Chemother Pharmacol*, 55(2), 159–169.
- Chen, Y., Shen, L., Zhang, F., Lau, S. S., van Breemen, R. B., Nikolic, D. und Bolton, J. L., 1998. The equine estrogen metabolite 4-hydroxyequilenin causes DNA single-strand breaks and oxidation of DNA bases in vitro. *Chem Res Toxicol*, 11(9), 1105–1111.
- Chen, Z.-H., Na, H.-K., Hurh, Y.-J. und Surh, Y.-J., 2005b. 4-Hydroxyestradiol induces oxidative stress and apoptosis in human mammary epithelial cells: possible protection by NF- κ B and ERK/MAPK. *Toxicol Appl Pharmacol*, 208(1), 46–56.
- Cheng, Z., Rios, G. R., King, C. D., Coffman, B. L., Green, M. D., Mojarrabi, B., Mackenzie, P. I. und Tephly, T. R., 1998. Glucuronidation of catechol estrogens by expressed human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 1A1, 1A3, and 2B7. *Toxicol Sci*, 45(1), 52–57.
- Cohen, L. A., Crespin, J. S., Wolper, C., Zang, E. A., Pittman, B., Zhao, Z. und Holt, P. R., 2007. Soy isoflavone intake and estrogen excretion patterns in young women: effect of probiotic administration. *In Vivo*, 21(3), 507–512.
- D’Amato, R. J., Lin, C. M., Flynn, E., Folkman, J. und Hamel, E., 1994. 2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(9), 3964–3968.
- Dawling, S., Hachey, D. L., Roodi, N. und Parl, F. F., 2004. In vitro model of mammary estrogen metabolism: structural and kinetic differences between catechol estrogens 2- and 4-hydroxyestradiol. *Chem Res Toxicol*, 17(9), 1258–1264.
- Dawling, S., Roodi, N., Mernaugh, R. L., Wang, X. und Parl, F. F., 2001. Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. *Cancer Res*, 61(18), 6716–6722.
- Devanesan, P. D., Todorovic, R., Zhao, J., Gross, M. L., Rogan, E. G. und Cavalieri, E. L., 2001. Catechol estrogen conjugates and DNA adducts in the kidney of male Syrian golden hamsters treated with 4-hydroxyestradiol: potential biomarkers for estrogen-initiated cancer. *Carcinogenesis*, 22(3), 489–497.
- Di Virgilio, A. L., Iwami, K., Watjen, W., Kahl, R. und Degen, G. H., 2004. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicol Lett*, 151(1), 151–162.
- Doehmer, J., 2003. The V79 Cell Battery: an analytical tool for predicting drug metabolism and metabolism dependent toxicity for humans. *Nova Acta Leopold*, 87(329, Molecular investigation of metabolism and transport of drugs: from animal to human tissue), 125–132.
- Doerge, D. R., Chang, H. C., Churchwell, M. I. und Holder, C. L., 2000. Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*, 28(3), 298–307.

- Dubois, M., De Waziers, I., Thome, J. P. und Kremers, P., 1996. P450 induction by Aroclor 1254 and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in cultured hepatocytes from rat, quail and man: interspecies comparison. *Comp Biochem Physiol, C: Pharmacol, Toxicol Endocrinol*, 113C(1), 51–59.
- van Duursen, M. B. M., Sanderson, J. T., de Jong, P. C., Kraaij, M. und van den Berg, M., 2004. Phytochemicals inhibit catechol-O-methyltransferase activity in cytosolic fractions from healthy human mammary tissues: Implications for catechol estrogen-induced DNA damage. *Toxicol Sci*, 81(2), 316–324.
- Eisenbrand, G. und Metzler, M., 2002. *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner: Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2. Auflage.
- Falany, J. L., Macrina, N. und Falany, C. N., 2002. Regulation of MCF-7 breast cancer cell growth by beta-estradiol sulfation. *Breast Cancer Res Treat*, 74(2), 167–176.
- Fisher, M. B., Campanale, K., Ackermann, B. L., Vandenbranden, M. und Wrighton, S. A., 2000. In vitro glucuronidation using human liver microsomes and the pore-forming peptide alamethicin. *Drug Metab Dispos*, 28(5), 560–566.
- Galijatovic, A., Otake, Y., Walle, U. K. und Walle, T., 2001. Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in Caco-2 cells—potential role in carcinogen bioinactivation. *Pharm Res*, 18(3), 374–379.
- Gall, W. E., Zawada, G., Mojarrabi, B., Tephly, T. R., Green, M. D., Coffman, B. L., Mackenzie, P. I. und Radominska-Pandya, A., 1999. Differential glucuronidation of bile acids, androgens and estrogens by human UGT1A3 and 2B7. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 70(1-3), 101–108.
- Gestl, S. A., Green, M. D., Shearer, D. A., Frauenhoffer, E., Tephly, T. R. und Weisz, J., 2002. Expression of UGT2B7, a UDP-glucuronosyltransferase implicated in the metabolism of 4-hydroxyestrone and all-trans retinoic acid, in normal human breast parenchyma and in invasive and in situ breast cancers. *Am J Pathol*, 160(4), 1467–1479.
- Glatt, H., 1997. Sulfation and sulfotransferases 4: bioactivation of mutagens via sulfation. *Faseb J*, 11(5), 314–321.
- Glatt, H., Boeing, H., Engelke, C. E., Ma, L., Kuhlow, A., Pabel, U., Pomplun, D., Teubner, W. und Meinel, W., 2001. Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. *Mutat Res*, 482(1-2), 27–40.
- Glatt, H., Gemperlein, I., Setiabudi, F., Platt, K. L. und Oesch, F., 1990. Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds. *Mutagenesis*, 5(3), 241–249.
- Guillemette, C., Belanger, A. und Lepine, J., 2004. Metabolic inactivation of estrogens in breast tissue by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: an overview. *Breast Cancer Res*, 6(6), 246–254.

- Halliwell, B. und Aruoma, O. I., 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, 281(1-2), 9–19.
- Hamajima, N., Matsuo, K., Tajima, K., Mizutani, M., Iwata, H., Iwase, T., Miura, S., Oya, H. und Obata, Y., 2001. Limited association between a catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism and breast cancer risk in Japan. *Int J Clin Oncol*, 6(1), 13–18.
- Han, X. und Liehr, J. G., 1994. DNA single-strand breaks in kidneys of Syrian hamsters treated with steroidal estrogens: hormone-induced free radical damage preceding renal malignancy. *Carcinogenesis*, 15(5), 997–1000.
- Hartwig, A., Dally, H. und Schlepegrell, R., 1996. Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicol Lett*, 88(1-3), 85–90.
- Hartwig, A., Klyszcz-Nasko, H., Schlepegrell, R. und Beyersmann, D., 1993. Cellular damage by ferric nitrilotriacetate and ferric citrate in V79 cells: interrelationship between lipid peroxidation, DNA strand breaks and sister chromatid exchanges. *Carcinogenesis*, 14(1), 107–112.
- Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J. F., Flamm, G. W., Williams, G. M. und Lines, T. C., 2007. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol*, 45(11), 2179–2205.
- Henderson, B. E., Ross, R. K., Pike, M. C. und Casagrande, J. T., 1982. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res*, 42(8), 3232–3239.
- Hiraku, Y., Yamashita, N., Nishiguchi, M. und Kawanishi, S., 2001. Catechol estrogens induce oxidative DNA damage and estradiol enhances cell proliferation. *Int J Cancer*, 92(3), 333–337.
- Hirose, Y., Tsutsui, T. W., Ohno, M., Barrett, J. C. und Tsutsui, T., 2007. Effects of a catechol-O-methyltransferase inhibitor on catechol estrogen-induced cellular transformation, chromosome aberrations and apoptosis in Syrian hamster embryo cells. *Int J Cancer*, 120(8), 1627–1633.
- Houston, J. B. und Kenworthy, K. E., 2000. In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model. *Drug Metab Dispos*, 28(3), 246–254.
- Huang, C. S., Chern, H. D., Chang, K. J., Cheng, C. W., Hsu, S. M. und Shen, C. Y., 1999. Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the estrogen-metabolizing genes CYP17, CYP1A1, and COMT: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res*, 59(19), 4870–4875.
- Hurh, Y.-J., Chen, Z.-H., Na, H.-K., Han, S. und Surh, Y.-J., 2004. 2-Hydroxyestradiol induces oxidative DNA damage and apoptosis in human mammary epithelial cells. *J Toxicol Environ Health, Part A*, 67(23-24), 1939–1953.

- Hutzler, J. M. und Tracy, T. S., 2002. Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions. *Drug Metab Dispos*, 30(4), 355–362.
- Jansson, A., Gunnarsson, C. und Stal, O., 2006. Proliferative responses to altered 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17HSD) type 2 expression in human breast cancer cells are dependent on endogenous expression of 17HSD type 1 and the estradiol receptors. *Endocr Relat Cancer*, 13(3), 875–884.
- Jiang, H., Xie, T., Ramsden, D. B. und Ho, S. L., 2003. Human catechol-O-methyltransferase down-regulation by estradiol. *Neuropharmacology*, 45(7), 1011–1018.
- Kerlan, V., Dreano, Y., Bercovici, J. P., Beaune, P. H., Floch, H. H. und Berthou, F., 1992. Nature of cytochromes P450 involved in the 2-/4-hydroxylations of estradiol in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 44(9), 1745–1756.
- Kern, M., Fridrich, D., Reichert, J., Skrbek, S., Nussler, A., Hofem, S., Vatter, S., Pahlke, G., Ruefer, C. und Marko, D., 2007. Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid. *Mol Nutr Food Res*, 51(9), 1163–1172.
- Khan, W. A., Alam, K. und Moinuddin, 2007. Catechol-estrogen modified DNA: a better antigen for cancer autoantibody. *Arch Biochem Biophys*, 465(1), 293–300.
- King, C. D., Green, M. D., Rios, G. R., Coffman, B. L., Owens, I. S., Bishop, W. P. und Tephly, T. R., 1996. The glucuronidation of exogenous and endogenous compounds by stably expressed rat and human UDP-glucuronosyltransferase 1.1. *Arch Biochem Biophys*, 332(1), 92–100.
- King, C. D., Rios, G. R., Green, M. D. und Tephly, T. R., 2000. UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab*, 1(2), 143–161.
- Knight, D. C. und Eden, J. A., 1996. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet Gynecol*, 87(5 Pt 2), 897–904.
- Korzekwa, K. R., Krishnamachary, N., Shou, M., Ogai, A., Parise, R. A., Rettie, A. E., Gonzalez, F. J. und Tracy, T. S., 1998. Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites. *Biochemistry*, 37(12), 4137–4147.
- Kulling, S. E., 2002. Phytoestrogene vom Isoflavontyp: Metabolismus und genetische Toxizität. Habilitationsschrift. Universität Karlsruhe (TH).
- Kulling, S. E., Honig, D. M. und Metzler, M., 2001. Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem*, 49(6), 3024–3033.
- Kulling, S. E., Honig, D. M., Simat, T. J. und Metzler, M., 2000. Oxidative in vitro metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *J Agric Food Chem*, 48(10), 4963–4972.

- Kulling, S. E., Lehmann, L. und Metzler, M., 2002. Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *J Chromatogr, B: Anal Technol Biomed Life Sci*, 777(1-2), 211–218.
- Kulling, S. E. und Metzler, M., 1997. Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. *Food Chem Toxicol*, 35(6), 605–613.
- Kulling, S. E., Rosenberg, B., Jacobs, E. und Metzler, M., 1999. The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol*, 73(1), 50–54.
- Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S. X., Simard, J., Labrie, C., El-Alfy, M., Pelletier, G. und Belanger, A., 2000. Intracrinology: role of the family of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J Mol Endocrinol*, 25(1), 1–16.
- Lake, B. G., 1987. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. In Snell, K. und Mulloch, B. (Hg.), *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*, 183–215. IRL Press, Oxford.
- Lamartiniere, C. A., Cotroneo, M. S., Fritz, W. A., Wang, J., Mentor-Marcel, R. und Elgavish, A., 2002. Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J Nutr*, 132(3), 552–558.
- Lapidot, T., Walker, M. D. und Kanner, J., 2002. Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H₂O₂ during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *J Agric Food Chem*, 50(11), 3156–3160.
- Lasic, D. D., 1995. *Liposomes: From physics to applications*. Elsevier, Amsterdam.
- Lavigne, J. A., Goodman, J. E., Fonong, T., Odwin, S., He, P., Roberts, D. W. und Yager, J. D., 2001. The effects of catechol-O-methyltransferase inhibition on estrogen metabolite and oxidative DNA damage levels in estradiol-treated MCF-7 cells. *Cancer Res*, 61(20), 7488–7494.
- Lavigne, J. A., Helzlsouer, K. J., Huang, H.-Y., Strickland, P. T., Bell, D. A., Selmin, O., Watson, M. A., Hoffman, S., Comstock, G. W. und Yager, J. D., 1997. An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-O-methyltransferase and the risk for breast cancer. *Cancer Res*, 57(24), 5493–5497.
- Lee, A. J., Cai, M. X., Thomas, P. E., Conney, A. H. und Zhu, B. T., 2003. Characterization of the oxidative metabolites of 17beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology*, 144(8), 3382–3398.
- Lehmann, L., Jiang, L. und Wagner, J., 2008. Soy isoflavones decrease the catechol-O-methyltransferase-mediated inactivation of 4-hydroxyestradiol in cultured MCF-7 cells. *Carcinogenesis*, 29(2), 363–370.
- Lehmann, L. und Wagner, J., 2008. Gene expression of 17beta-estradiol-metabolizing isozymes: comparison of normal human mammary gland to normal human liver and to cultured human breast adenocarcinoma cells. *Adv Exp Med Biol*, 617, 617–624.

- Lekas, P., Tin, K. L., Lee, C. und Prokipcak, R. D., 2000. The human cytochrome P450 1A1 mRNA is rapidly degraded in HepG2 cells. *Arch Biochem Biophys*, 384(2), 311–318.
- Lepine, J., Bernard, O., Plante, M., Tetu, B., Pelletier, G., Labrie, F., Belanger, A. und Guillemette, C., 2004. Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholestrogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphospho-glucuronosyltransferases expressed in endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(10), 5222–5232.
- Li, K.-M., Todorovic, R., Devanesan, P. D., Higginbotham, S. M., Koefeler, H., Ramanathan, R., Gross, M. L., Rogan, E. G. und Cavalieri, E. L., 2004. Metabolism and DNA binding studies of 4-hydroxyestradiol and estradiol-3,4-quinone in vitro and in female ACI rat mammary gland in vivo. *Carcinogenesis*, 25(2), 289–297.
- Li, Y., Trush, M. A. und Yager, J. D., 1994. DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. *Carcinogenesis*, 15(7), 1421–1427.
- Liehr, J. G., 1990. Genotoxic effects of estrogens. *Mutat Res, Reviews in Genetic Toxicology*, 238(3), 269–276.
- Liehr, J. G., 1994. Mechanisms of metabolic activation and inactivation of catechol estrogens: a basis of genotoxicity. *Polycycl Aromat Compd*, 6(1-4), 229–239.
- Liehr, J. G., 1997. Dual role of estrogens as hormones and pro-carcinogens: tumour initiation by metabolic activation of oestrogens. *Eur J Cancer Prev*, 6(1), 3–10.
- Liehr, J. G., 2000. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev*, 21(1), 40–54.
- Liehr, J. G., Fang, W. F., Sirbasku, D. A. und Ari-Ulubelen, A., 1986. Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters. *J Steroid Biochem*, 24(1), 353–356.
- Liehr, J. G. und Roy, D., 1990. Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radic Biol Med*, 8(4), 415–423.
- Lin, P.-H., Nakamura, J., Yamaguchi, S., Asakura, S. und Swenberg, J. A., 2003. Aldehydic DNA lesions induced by catechol estrogens in calf thymus DNA. *Carcinogenesis*, 24(6), 1133–1141.
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H. und Schubert, D., 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*, 69(2), 581–593.
- Löffler, G. und Petrides, P. E., 1998. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 6. Auflage.
- Long, L. H., Clement, M. V. und Halliwell, B., 2000. Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun*, 273(1), 50–53.

- Longcope, C., 1984. Estriol production and metabolism in normal women. *J Steroid Biochem*, 20(4B), 959–962.
- Lu, F., Zahid, M., Saeed, M., Cavalieri, E. L. und Rogan, E. G., 2007. Estrogen metabolism and formation of estrogen-DNA adducts in estradiol-treated MCF-10F cells. The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induction and catechol-O-methyltransferase inhibition. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 105(1-5), 150–158.
- Lu, L.-J. W., Anderson, K. E., Grady, J. J. und Nagamani, M., 1996. Effects of soy consumption for one month on steroid hormones in premenopausal women: implications for breast cancer risk reduction. *Cancer Epidemiol*, 5(1), 63–70.
- Mackenzie, P. I., Bock, K. W., Burchell, B., Guillemette, C., Ikushiro, S.-I., Iyanagi, T., Miners, J. O., Owens, I. S. und Nebert, D. W., 2005a. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics*, 15(10), 677–685.
- Mackenzie, P. I., Gregory, P. A., Lewinsky, R. H., Yasmin, S. N., Height, T., McKinnon, R. A. und Gardner-Stephen, D. A., 2005b. Polymorphic variations in the expression of the chemical detoxifying UDP glucuronosyltransferases. *Toxicol Appl Pharmacol*, 207(2, Suppl. 1), 77–83.
- Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J. R., Ritter, J. K., Schachter, H., Tephly, T. R., Tipton, K. F. und Nebert, D. W., 1997. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, 7(4), 255–269.
- Mackenzie, P. I., Rodbourne, L. und Stranks, S., 1992. Steroid UDP glucuronosyltransferases. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 43(8), 1099–1105.
- Mannisto, P. T. und Kaakkola, S., 1999. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev*, 51(4), 593–628.
- Martucci, C. P. und Fishman, J., 1993. P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacol Ther*, 57(2-3), 237–257.
- Matern, H., Heinemann, H. und Matern, S., 1994. Radioassay of UDP-glucuronosyltransferase activities toward endogenous substrates using labeled UDP-glucuronic acid and an organic solvent extraction procedure. *Anal Biochem*, 219, 182–188.
- Meech, R. und Mackenzie, P. I., 1997. UDP-glucuronosyltransferase, the role of the amino terminus in dimerization. *J Biol Chem*, 272(43), 26 913–26 917.
- Messina, M., Nagata, C. und Wu, A. H., 2006. Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutr Cancer*, 55(1), 1–12.
- Miura, T., Muraoka, S., Fujimoto, Y. und Zhao, K., 2000a. DNA damage induced by catechol derivatives. *Chem Biol Interact*, 126(2), 125–136.

- Miura, T., Muraoka, S., Fujimoto, Y. und Zhao, K., 2000b. DNA strand break and 8-hydroxyguanine formation induced by 2-hydroxyestradiol dispersed in liposomes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 74(3), 93–98.
- Mobley, J. A., Bhat, A. S. und Brueggemeier, R. W., 1999. Measurement of oxidative DNA damage by catechol estrogens and analogs in vitro. *Chem Res Toxicol*, 12(3), 270–277.
- Mueck, A. O. und Seeger, H., 2007. Breast cancer: Are estrogen metabolites carcinogenic? *Maturitas*, 57(1), 42–46.
- Murata, M., Midorikawa, K., Koh, M., Umezawa, K. und Kawanishi, S., 2004. Genistein and daidzein induce cell proliferation and their metabolites cause oxidative DNA damage in relation to isoflavone-induced cancer of estrogen-sensitive organs. *Biochemistry*, 43(9), 2569–2577.
- Nagata, C., Takatsuka, N., Kawakami, N. und Shimizu, H., 2002. A prospective cohort study of soy product intake and stomach cancer death. *Br J Cancer*, 87(1), 31–36.
- Newbold, R. R. und Liehr, J. G., 2000. Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by catechol estrogens. *Cancer Res*, 60(2), 235–237.
- Nutter, L. M., Wu, Y. Y., Ngo, E. O., Sierra, E. E., Gutierrez, P. L. und Abul-Hajj, Y. J., 1994. An o-quinone form of estrogen produces free radicals in human breast cancer cells: correlation with DNA damage. *Chem Res Toxicol*, 7(1), 23–28.
- Parkin, K. L., 2003. Putting kinetic principles into practice. In Marangoni, A. G. (Hg.), *Enzyme kinetics: a modern approach*, 174–192. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Peters, W. H. und Jansen, P. L., 1986. Microsomal UDP-glucuronyltransferase-catalyzed bilirubin diglucuronide formation in human liver. *J Hepatol*, 2(2), 182–194.
- Peters, W. H., Jansen, P. L. und Nauta, H., 1984. The molecular weights of UDP-glucuronyltransferase determined with radiation-inactivation analysis. A molecular model of bilirubin UDP-glucuronyltransferase. *J Biol Chem*, 259(19), 11 701–11 705.
- Pfeiffer, E., Treiling, C. R., Hoehle, S. I. und Metzler, M., 2005. Isoflavones modulate the glucuronidation of estradiol in human liver microsomes. *Carcinogenesis*, 26(12), 2172–2178.
- Radomska-Pandya, A., Little, J. M. und Czernik, P. J., 2001. Human UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *Curr Drug Metab*, 2(3), 283–298.
- Rao, C. V., Wang, C. X., Simi, B., Lubet, R., Kelloff, G., Steele, V. und Reddy, B. S., 1997. Enhancement of experimental colon cancer by genistein. *Cancer Res*, 57(17), 3717–3722.
- Rivera-Portalatin, N. M., Vera-Serrano, J. L., Prokai-Tatrai, K. und Prokai, L., 2007. Comparison of estrogen-derived ortho-quinone and para-quinol concerning induction of oxidative stress. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 105(1-5), 71–75.

- Rodriguez-Antona, C., Donato, M. T., Boobis, A., Edwards, R. J., Watts, P. S., Castell, J. V. und Gomez-Lechon, M. J., 2002. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica*, 32(6), 505–520.
- Rogan, E. G., Badawi, A. F., Devanesan, P. D., Meza, J. L., Edney, J. A., West, W. W., Higginbotham, S. M. und Cavalieri, E. L., 2003. Relative imbalances in estrogen metabolism and conjugation in breast tissue of women with carcinoma: potential biomarkers of susceptibility to cancer. *Carcinogenesis*, 24(4), 697–702.
- Rossi, D., Aiello, V., Mazzoni, L., Sensi, A. und Calzolari, E., 2007. In vitro short-term test evaluation of catecholestrogens genotoxicity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 105(1-5), 98–105.
- Roy, D., Cai, Q., Felty, Q. und Narayan, S., 2007. Estrogen-induced generation of reactive oxygen and nitrogen species, gene damage, and estrogen-dependent cancers. *J Toxicology Environ Health, Part B: Critical Reviews*, 10(4), 235–257.
- Roy, D. und Liehr, J. G., 1999. Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutat Res*, 424(1-2), 107–115.
- Roy, D. und Singh, K. P., 2004. Estrogen-induced genetic alterations and their role in carcinogenicity. *Curr Genomics*, 5(3), 245–257.
- Roy, D., Weisz, J. und Liehr, J. G., 1990. The O-methylation of 4-hydroxyestradiol is inhibited by 2-hydroxyestradiol: implications for estrogen-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11(3), 459–462.
- Ruefer, C., 2005. Bioverfügbarkeit, Metabolismus und biologische Aktivität von Isoflavonen und deren Metaboliten. Doktorarbeit, Universität Karlsruhe (TH).
- Rueff, J., Chiapella, C., Chipman, J. K., Darroudi, F., Duarte Silva, I., Duverger-van Bogaert, M., Fonti, E., Glatt, H. R., Isern, P. und et al., 1996. Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays. *Mutat Res, Fundam Mol Mech Mutagen*, 353(1,2), 151–176.
- Satoh, T., Tomikawa, Y., Takanashi, K., Itoh, S. und Yoshizawa, I., 2004. Studies on the interactions between drugs and estrogen. III. Inhibitory effects of 29 drugs reported to induce gynecomastia on the glucuronidation of estradiol. *Biol Pharm Bull*, 27(11), 1844–1849.
- Schweigert, N., Zehnder, A. J. B. und Eggen, R. I. L., 2001. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ Microbiol*, 3(2), 81–91.
- Sellers, T. A., Schildkraut, J. M., Pankratz, V. S., Vierkant, R. A., Fredericksen, Z. S., Olson, J. E., Cunningham, J., Taylor, W., Liebow, M., McPherson, C., Hartmann, L. C., Pal, T. und Adjei, A. A., 2005. Estrogen bioactivation, genetic polymorphisms, and ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(11), 2536–2543.

- Senafi, S. B., Clarke, D. J. und Burchell, B., 1994. Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. *Biochem J*, 303(1), 233–240.
- Shelby, M. K., Cherrington, N. J., Vansell, N. R. und Klaassen, C. D., 2003. Tissue mRNA expression of the rat UDP-glucuronosyltransferase gene family. *Drug Metab Dispos*, 31(3), 326–333.
- Silbernagl, S. und Despopoulos, A., 2001. Taschenatlas der Physiologie. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 5. Auflage.
- da Silva, J., Herrmann, S. M., Heuser, V., Peres, W., Possa Marroni, N., Gonzalez-Gallego, J. und Erdtmann, B., 2002. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol*, 40(7), 941–947.
- Singh, S., Chakravarti, D., Edney, J. A., Hollins, R. R., Johnson, P. J., West, W. W., Higginbotham, S. M., Cavalieri, E. L. und Rogan, E. G., 2005. Relative imbalances in the expression of estrogen-metabolizing enzymes in the breast tissue of women with breast carcinoma. *Oncol Rep*, 14(4), 1091–1096.
- Soars, M. G., Ring, B. J. und Wrighton, S. A., 2003. The effect of incubation conditions on the enzyme kinetics of udp-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos*, 31(6), 762–767.
- Stack, D. E., Byun, J., Gross, M. L., Rogan, E. G. und Cavalieri, E. L., 1996. Molecular characteristics of catechol estrogen quinones in reactions with deoxyribonucleosides. *Chem Res Toxicol*, 9(5), 851–859.
- Stone, A. N., MacKenzie, P. I., Galetin, A., Houston, B. J. und Miners, J. O., 2003. Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human UDP-glucuronosyltransferases: evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. *Drug Metab Dispos*, 31(9), 1086–1089.
- Suzuki, M., Kurosaki, T., Arai, T., Sawabe, M., Hosoi, T. und Kitamura, T., 2007. The Val158Met polymorphism of the catechol-O-methyltransferase gene is not associated with the risk of sporadic or latent prostate cancer in Japanese men. *Int J Urol*, 14(9), 800–804.
- Takahashi, S., Abe, T., Gotoh, J. und Fukuuchi, Y., 2002. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochem Int*, 40(5), 441–448.
- Tang, W., Stearns, R. A., Kwei, G. Y., Iliff, S. A., Miller, R. R., Egan, M. A., Yu, N. X., Dean, D. C., Kumar, S., Shou, M., Lin, J. H. und Baillie, T. A., 1999a. Interaction of diclofenac and quinidine in monkeys: stimulation of diclofenac metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*, 291(3), 1068–1074.
- Tang, W., Stearns, R. A., Wang, R. W., Chiu, S.-H. L. und Baillie, T. A., 1999b. Roles of human hepatic cytochrome P450s 2C9 and 3A4 in the metabolic activation of diclofenac. *Chem Res Toxicol*, 12(2), 192–199.

- Tchou, J., Bodepudi, V., Shibutani, S., Antoshechkin, I., Miller, J., Grollman, A. P. und Johnson, F., 1994. Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. *J Biol Chem*, 269(21), 15 318–15 324.
- Thibaudeau, J., Lepine, J., Tojcic, J., Duguay, Y., Pelletier, G., Plante, M., Brisson, J., Tetu, B., Jacob, S., Perusse, L., Belanger, A. und Guillemette, C., 2006. Characterization of common UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 variants with different capacities to inactivate mutagenic 4-hydroxylated metabolites of estradiol and estrone. *Cancer Res*, 66(1), 125–133.
- Thibaudeau, P. A., Pasquier, C. und Gougerot-Pocidallo, M.-A., 2004. Measurement of copper(I) formation as a test for the stability of catecholestrogens and methoxyestrogens in solution. *Steroids*, 69(6), 419–423.
- Thomas, H. V., Reeves, G. K. und Key, T. J., 1997. Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer: a quantitative review. *Cancer Causes Control*, 8(6), 922–928.
- Torchilin, V. und Weissig, V., 2003. *Liposomes: a practical approach*. Oxford Univ Press, Oxford, 2. Auflage.
- Tracy, T. S. und Hummel, M. A., 2004. Modeling kinetic data from in vitro drug metabolism enzyme experiments. *Drug Metab Rev*, 36(2), 231–242.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Yagi, E. und Barrett, J. C., 2000. Involvement of genotoxic effects in the initiation of estrogen-induced cellular transformation: studies using Syrian hamster embryo cells treated with 17beta-estradiol and eight of its metabolites. *Int J Cancer*, 86(1), 8–14.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Hagiwara, M., Miyachi, T., Hikiba, H., Kubo, C. und Barrett, J. C., 2000. Induction of mammalian cell transformation and genotoxicity by 2-methoxyestradiol, an endogenous metabolite of estrogen. *Carcinogenesis*, 21(4), 735–740.
- Tukey, R. H. und Strassburg, C. P., 2001. Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. *Mol Pharmacol*, 59(3), 405–414.
- Uchaipichat, V., Mackenzie, P. I., Guo, X. H., Gardner-Stephen, D., Galetin, A., Houston, J. B. und Miners, J. O., 2004. Human udp-glucuronosyltransferases: isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid. *Drug Metab Dispos*, 32(4), 413–423.
- Vihko, P., Harkonen, P., Soronen, P., Torn, S., Herrala, A., Kurkela, R., Pulkka, A., Oduwale, O. und Isomaa, V., 2004. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases-their role in pathophysiology. *Mol Cell Endocrinol*, 215(1-2), 83–88.
- Vore, M., Liu, Y. und Huang, L., 1997. Cholestatic properties and hepatic transport of steroid glucuronides. *Drug Metab Rev*, 29(1-2), 183–203.

- Waetjen, W., Michels, G., Steffan, B., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkoetter, A., Tran-Thi, Q.-H., Proksch, P. und Kahl, R., 2005. Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J Nutr*, 135(3), 525–531.
- Walle, T., Otake, Y., Galijatovic, A., Ritter, J. K. und Walle, U. K., 2000. Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in the human hepatoma cell line HepG2. *Drug Metab Dispos*, 28(9), 1077–1082.
- Weisz, J., Bui, Q. D., Roy, D. und Liehr, J. G., 1992. Elevated 4-hydroxylation of estradiol by hamster kidney microsomes: a potential pathway of metabolic activation of estrogens. *Endocrinology*, 131(2), 655–661.
- Wen, W., Ren, Z., Shu, X. O., Cai, Q., Ye, C., Gao, Y. T. und Zheng, W., 2007. Expression of cytochrome P450 1B1 and catechol-O-methyltransferase in breast tissue and their associations with breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16(5), 917–920.
- Westerink, W. M. A. und Schoonen, W. G. E. J., 2007. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol in Vitro*, 21(8), 1592–1602.
- Westphal, U., 1977. Binding of steroid hormones to serum proteins. *Klin Wochenschr*, 55(18), 877–880.
- Wilkening, S. und Bader, A., 2003. Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *J biochem mol toxicol*, 17(4), 207–213.
- Williams, J. A. und Phillips, D. H., 2000. Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role in breast cancer. *Cancer Res*, 60(17), 4667–4677.
- Williams, J. A., Ring, B. J., Cantrell, V. E., Campanale, K., Jones, D. R., Hall, S. D. und Wrighton, S. A., 2002. Differential modulation of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)-catalyzed estradiol-3-glucuronidation by the addition of UGT1A1 substrates and other compounds to human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 30(11), 1266–1273.
- Wong, H., Tong, V., Riggs, K. W., Rurak, D. W., Abbott, F. S. und Kumar, S., 2007. Kinetics of valproic acid glucuronidation: evidence for in vivo autoactivation. *Drug Metab Dispos*, 35(8), 1380–1386.
- Yager, J. D. und Liehr, J. G., 1996. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Ann rev pharmacol toxicol*, 36, 203–232.
- Yagi, E., Barrett, J. C. und Tsutsui, T., 2001. The ability of four catechol estrogens of 17beta-estradiol and estrone to induce DNA adducts in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Carcinogenesis*, 22(9), 1505–1510.
- Zahid, M., Kohli, E., Saeed, M., Rogan, E. und Cavalieri, E. L., 2006. The greater reactivity of estradiol-3,4-quinone vs. estradiol-2,3-quinone with DNA in the formation of depurinating adducts: implications for tumor-initiating activity. *Chem Res Toxicol*, 19(1), 164–172.

- Zahid, M., Saeed, M., Lu, F., Gaikwad, N., Rogan, E. G. und Cavalieri, E. L., 2007. Inhibition of catechol-O-methyltransferase increases estrogen-DNA adduct formation. *Free Radic Biol Med*, 43(11), 1534–1540.
- Zhang, Y., Gaikwad, N. W., Olson, K., Zahid, M., Cavalieri, E. L. und Rogan, E. G., 2007. Cytochrome P450 isoforms catalyze formation of catechol estrogen quinones that react with DNA. *Metabolism*, 56(7), 887–894.
- Zhang, Y., Hendrich, S. und Murphy, P. A., 2003. Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women. *J Nutr*, 133(2), 399–404.
- Zhu, B. T., 2002. Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis. *Curr Drug Metab*, 3(3), 321–349.
- Zhu, B. T. und Conney, A. H., 1998a. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis*, 19(1), 1–27.
- Zhu, B. T. und Conney, A. H., 1998b. Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis? *Cancer Res*, 58(11), 2269–2277.
- Zhu, B. T., Ezell, E. L. und Liehr, J. G., 1994. Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. *J Biol Chem*, 269(1), 292–299.
- Zhu, B. T. und Liehr, J. G., 1996. Inhibition of catechol O-methyltransferase-catalyzed O-methylation of 2- and 4-hydroxyestradiol by quercetin. Possible role in estradiol-induced tumorigenesis. *J Biol Chem*, 271(3), 1357–1363.

A. Anhang

A.1. Externe Kalibrierungen

Tabelle A.1.: Ein-Punkt-Kalibrierungen der CEs (5 nmol), des Quercetins (5 nmol) sowie des TMBPA (1 nmol). Dargestellt sind jeweils MW \pm SD von 8 Einspritzungen.

Substanz	Peakfläche
2-HO-E1	594002 \pm 39904
2-HO-E2	657541 \pm 69934
4-HO-E1	343420 \pm 40715
4-HO-E2	383750 \pm 15433
Quercetin	1162638 \pm 182983
TMBPA	115855 \pm 4045

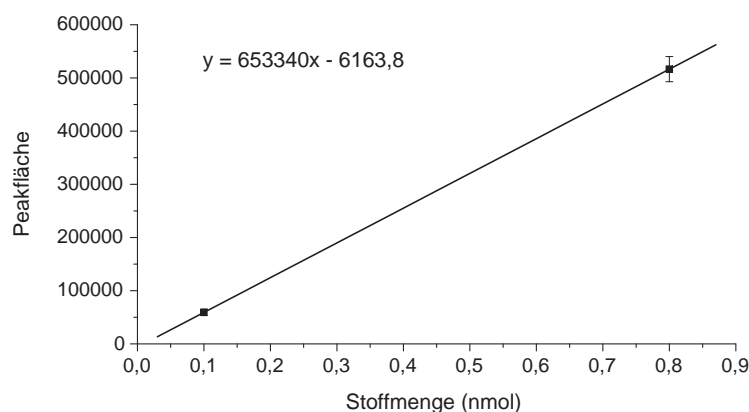


Abbildung A.1.: Zwei-Punkte-Kalibrierung von Genistein (0,1 und 0,8 nmol). Dargestellt sind jeweils MW \pm SD von 5 Einspritzungen. Die Kurvenanpassung und Berechnung erfolgte mit dem Computerprogramm OriginPro 6.0 (OriginLab Corporation, Northampton, Ma, USA) durch lineare Regressionsanalyse.

A.2. Methylierung der CEs mit V79-Zelllysats – Berücksichtigung der Umwandlung durch HSDs

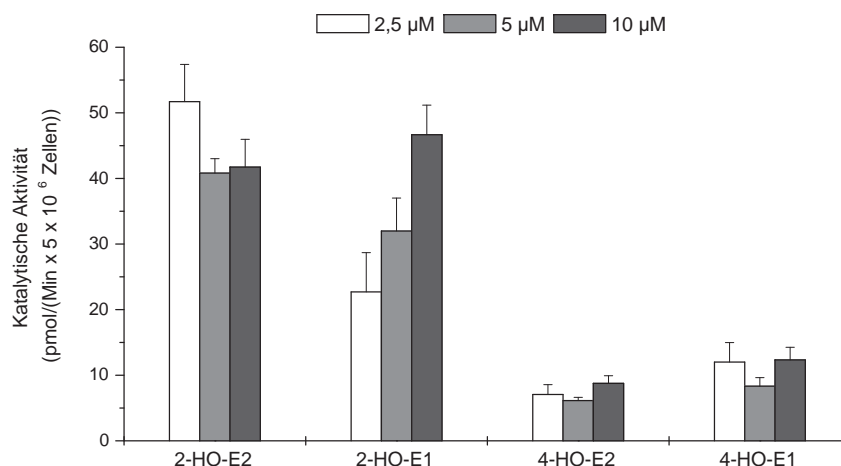


Abbildung A.2.: Methylierung der CEs (2,5 - 10 μM) mit Zelllysats von V79-Zellen (10×10^6 Zellen/ml) unter Berücksichtigung der Umwandlung durch HSDs. Die katalytische Aktivität wurde in $\text{pmol}/(\text{Min} \times 5 \times 10^6 \text{ Zellen})$ angegeben, da 5×10^6 Zellen einem Gesamtproteingehalt von 1 mg entsprechen (s. 3.1.3). Die abgebildeten Werte repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SW}$ von zwei unabhängigen Experimenten.

A.3. Zusammensetzung der verwendeten DME-Medien

Tabelle A.2.: Unterschiede in der Zusammensetzung der verwendeten DME-Medien. s, Pulvermedium; l, Flüssigmedium.

	MP Biomedicals (s)	Sigma/Aldrich (s) (mg/l)	Sigma/Aldrich (l)
Natriumbikarbonat	2,25	3,7	3,7
Pyridoxin-HCl	4	–	4
Pyridoxal-HCl	–	4	–
Natriumpyruvat	110	–	110

A.4. Einfluss der Isoflavone auf die COMT-Aktivität in MCF-7- und HepG2-Zellen – Berücksichtigung der Zellzahl

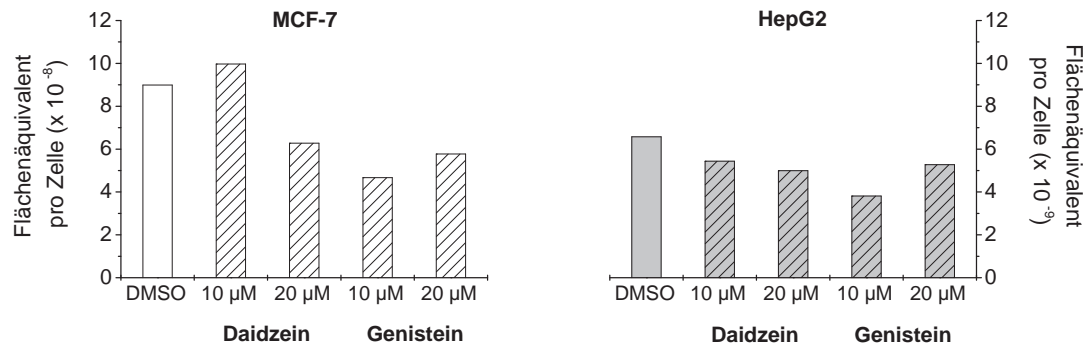


Abbildung A.3.: Summe der Methylierungsprodukte von 2-HO-E2, bezogen auf die Zellzahl, nach 72-stündiger Inkubation mit Daidzein (10 bzw. 20 μ M) oder Genistein (10 bzw. 20 μ M) in MCF-7- (links) und HepG2-Zellen (rechts). Die Inkubationszeit mit 2-HO-E2 (2,5 μ M) betrug 1 h. Die abgebildeten Werte stammen aus einem Experiment.

B. Publikationen

Publikationen in Fachzeitschriften

Gerstner, S., Pfeiffer, E., Metzler, M., 2008. Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Catecholestrogene in verschiedenen Zelllinien. *Lebensmittelchemie*, 62(4), 99.

Gerstner, S., Glasemann, D., Pfeiffer, E., Metzler, M., 2008. The influence of metabolism on the genotoxicity of catechol estrogens in three cultured cell lines. *Mol Nutr Food Res*, 52, 823 - 829.

Gerstner, S., Gumbel-Mako, S., Pfeiffer, E., Metzler, M., 2008. Effect of liposomes on the uptake of catechols into V79 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 377 (Suppl. 1), 449.

Gerstner, S., Pfeiffer, E., Metzler, M., 2007. Methylation of catechol estrogens in human cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 375 (Suppl. 1), 358.

Gerstner, S., Glasemann, D., Pfeiffer, E., Metzler, M., 2007. Methylierung von Catecholestrogenen in humanen HepG2 Leberkrebszellen. *Lebensmittelchemie*, 61(2), 40 - 41.

Pfeiffer, E., Graf, E., Gerstner, S., Metzler, M., 2006. Stimulation of estradiol glucuronidation: A protective mechanism against estradiol-mediated carcinogenesis? *Mol Nutr Food Res*, 50, 385 - 389.

Gerstner, S., Pfeiffer, E., Metzler, M., 2006. Methylation of catechol estrogens in human MCF-7 breast cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 372 (Suppl. 1), 360.

Beiträge auf Kongressen und Fachtagungen

Gerstner, S., Gumbel-Mako, S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Effect of liposomes on the uptake of catechols into V79 cells. BW Toxnet Meeting, Tübingen, 23.07.2008. Abstract-Band, S. 20.

Gerstner, S., Gumbel-Mako, S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Effect of liposomes on the uptake of catechols into V79 cells. 49. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 11. - 13.03.2008. Programmheft, S. 108.

Gerstner, S., Glasemann, D., Pfeiffer, E., Metzler, M. The influence of metabolism on the genotoxicity of catechol estrogens in three cultured cell lines, Wissenschaftliches Symposium Food Chemistry & Toxicology – Cornerstones of Life Sciences in Chemistry, Kaiserslautern, 28.09.2007. Abstract-Band, S. 51 - 52.

Gerstner, S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Catecholestrogene in verschiedenen Zelllinien. 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Nürnberg-Erlangen, 10. - 12.09.2007. Abstract-Band, S. 187.

Gerstner, S., Glasemann, D., Pfeiffer, E., Metzler, M. Methylation of catechol estrogens in human cancer cells. BW Toxnet Meeting, Karlsruhe, 10.07.2007. Abstract-Band, S. 30.

Gerstner, S., Glasemann, D., Pfeiffer, E., Metzler, M. Methylation of catechol estrogens in human cancer cells. 48. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 13. - 15.03.2007. Programmheft, S. 111.

Gerstner, S., Glasemann, D., Pfeiffer, E., Metzler, M. Methylierung von Catecholestrogenen in humanen HepG2 Leberkrebszellen. 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, 18. - 21.09.2006. Abstract-Band, S. 273.

Gerstner, S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Methylation of catechol estrogens in human breast cancer cells (MCF-7). 47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 04. - 06.04.2006. Programmheft, S. 104.

Gerstner, S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Methylierung von Catecholestrogenen in humanen Brustkrebszellen (MCF-7). Regionaltagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft Südwest, Karlsruhe, 03. - 04.03.2006.

C. Danksagung

Bei allen, die zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken:

- Herrn Prof. Dr. Dr. M. Metzler für die Bereitstellung des interessanten Themas, die tolle Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die freundliche Unterstützung meiner Arbeit,
- Erika Pfeiffer für ihre unzähligen Ideen, Anregungen und Aufmunterungen sowie für die Zeit, die sie sich in jeder Phase dieser Arbeit für mich nahm,
- Simone Höhle für die wertvollen Tipps beim Zusammenschreiben der Arbeit und ihren Einsatz beim Korrekturlesen,
- Dörte Glasemann und Szidónia Gumbel-Mako für die zuverlässige Unterstützung im Rahmen ihrer Diplomarbeiten,
- Iris Mackiw und Anke Pelzer für ihre Hilfe bei Arbeiten in der Zellkultur und der Durchführung der alkalischen Entwindung,
- Doris Honig für Rat und Tat bezüglich der HPLC,
- Julia Dempe für das sorgfältige Korrigieren dieser Arbeit, aber vor allem für die gute Bürokommunikation,
- allen Mitarbeitern des Instituts, besonders Simon Göckler, Julia Dempe, Jörg Wagner und Simone Höhle, für das gute Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft während der gesamten Dauer meiner Arbeit.

Besonders bedanke ich mich bei:

- Andreas für seine Hilfe bei allen aufgetretenen Computer- bzw. Latexproblemen, für seine Aufmunterungen, seine Geduld sowie sein Verständnis,
- meinen Eltern, für ihren unermüdlichen Einsatz, vor allem während meines Studiums, und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Lebenslauf

Name	Silke Gerstner
Geburtsdatum	01. Juni 1977
Geburtsort	Baden-Baden
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

08/1983 - 06/1987	Grundschule Weisenbach
08/1987 - 06/1993	Realschule Gernsbach Abschluss: Mittlere Reife
08/1993 - 06/1996	Anne-Frank-Schule Rastatt, Ernährungswissenschaftliches Gymnasium Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

09/1996 - 06/1999	Ausbildung zur Chemielaborantin am Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Technische Chemie, Bereich Chemisch-Physikalische Verfahren
-------------------	--

Berufspraxis

07/1999 - 09/1999	Chemielaborantin am Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Technische Chemie, Bereich Chemisch-Physikalische Verfahren
-------------------	---

Hochschulbildung

10/1999 - 02/2005	Studium der Ernährungswissenschaft an der Universität Hohenheim
10/2003 - 07/2004	Diplomarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, Arbeitskreis Hormonwirkung und Signaltransduktion Thema: Einfluss von (-)-Epigallocatechin-3-gallat auf die Aktivierung und Expression des Estrogenrezeptors in humanen Brustkrebszellen Abschluss: Diplom-Ernährungswissenschaftlerin

Promotion

seit 04/2005

Wissenschaftliche Angestellte an der Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilungen für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. M. Metzler